



Rôle de la protéine Cdk5 en réponse aux dommages de l'ADN : implications dans les points de contrôle S et G2/M

Sara Chiker

► To cite this version:

Sara Chiker. Rôle de la protéine Cdk5 en réponse aux dommages de l'ADN : implications dans les points de contrôle S et G2/M. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA11T001 . tel-01249397

HAL Id: tel-01249397

<https://theses.hal.science/tel-01249397>

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris-Sud

Faculté de Médecine

Ecole doctorale de Cancérologie: Biologie, Médecine, Santé

THESE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

LABORATOIRE: INSERM U612 - Institut Curie

DISCIPLINE: Biologie

SPÉCIALITÉ: Génétique et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le 20/01/2015 par

Sara CHIKER TAIBI

Rôle de la protéine Cdk5 en réponse aux dommages de l'ADN: implications dans les points de contrôle S et G2/M

Devant le jury composé de

Pr Simon SAULE
Dr Philippe PASERO
Dr Pablo RADICELLA
Dr Patricia KANNOUCHE
Dr Youlia KIROVA
Dr Marie FERNET

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie chaleureusement le Professeur Simon Saule d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je tiens également à vous remercier pour la passion de la science que vous avez su nous transmettre durant vos enseignements de master au sein de l'université Paris Sud-11 et qui m'ont bien aidé à choisir ma voie.

Je remercie le Docteur Pablo Radicella et le Docteur Philippe Pasero de m'avoir fait l'immense honneur d'être rapporteurs de mon mémoire de thèse.

Je remercie très sincèrement le Docteur Patricia Kannouche d'avoir accepté de juger ce travail et d'avoir été mon tuteur de thèse tout au long de ces trois années, un très grand merci pour vos conseils et nos discussions qui m'ont permis de recadrer ce travail et de relever bien des défis.

Je remercie également le Docteur Youlia Kirova d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Docteur Marie Fernet d'avoir relevé le défi d'encadrer une thèse. Merci de m'avoir accompagné et formé pendant ces années, de m'avoir soutenu et d'avoir supporté mes grands moments de stress. Merci pour ta confiance, ton côté humain, ton aide et ta grande générosité.

Je remercie également le Dr Janet Hall ma directrice d'unité, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité U612, d'avoir cru en moi, de m'avoir offert bien des opportunités. Merci de m'avoir transmis cette curiosité scientifique et cette passion contagieuse et toujours extrêmement positive, merci pour ton ouverture d'esprit qui m'a permis d'aller là où les lignées cellulaires ont bien voulu m'emmener, merci de m'avoir permis de travailler sur le stress réplicatif et d'avoir accepté de financer chacune de mes expériences mêmes les plus couteuses sans aucune hésitation.

Mes remerciements vont également à l'égard des grands chercheurs que j'ai eu la chance de croiser sur mon chemin et qui m'ont appris bien des choses,

Tout d'abord je tiens à remercier le Dr Vincent Pennaneach, qui autours d'un café à toujours une bonne idée à proposer. Merci de m'avoir appris à avoir l'esprit critique, de m'avoir conseillé et aidé bien des fois, merci de m'avoir appris à être autonome et confiante.

Je tiens à remercier le Dr Sarah Lambert pour toutes nos discussions, pour tes conseils, ton esprit critique, je te remercie d'avoir accepté de relire mon article, de m'avoir conseillé, corrigé et beaucoup appris.

Je tiens également à remercier le Dr Pierre Marie Girard pour toutes nos discussions scientifiques, pour tous tes conseils et tes commentaires, mais surtout je te serai à jamais reconnaissante pour les derniers microlitres de ce vieil anticorps d'anti ssDNA qui marchait si bien, que tu m'as offert et qui a sauvé mes manipes de peignage !

Je remercie le Dr Mounira Amor-Guérét pour toutes les discussions scientifiques que nous avons pu avoir, mais aussi pour m'avoir permis de me former au sein de son équipe qui est aussi devenu un peu la mienne.

Enfin je voudrais remercier Géraldine Buhagiar, qui m'a appris à faire du peignage moléculaire et des SCE, qui m'a formé et qui a partagé avec moi chacune de ses petites astuces et de ses petits secrets et qui un peu comme un grand chef pâtissier a partagé avec moi ses plus belles œuvres. Un très grand merci à toi pour ta patience et ta gentillesse.

Je remercie aussi tous nos collaborateurs, particulièrement le Dr Damarys Loew et Florent Dignili de la plateforme de spectrométrie de masse, le Dr Frédérique Pouzoulet et Christophe Roulin de la plateforme Radex, le Dr Fabrice Cordelières de la plateforme de microscopie, le Dr Ivan Bieche et Sophie Vacher de l'hôpital de l'institut Curie, ainsi que le Dr Jérôme Guittou de l'hôpital Lyon Sud. Merci à tous pour votre aide et vos conseils.

Je remercie également le ministère de la recherche, l'université Paris-11 et l'institut Curie qui m'ont financé au cours des 3 années de thèse et sans qui ce travail n'aurait jamais pu voir le jour !

A l'U612

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser, connaître, et apprécié au sein de cette unité.

Tout d'abord mes Co-bureaux, par ordre chronologique Laurence Vaslin, tu m'as connu à mes tout débuts toute timide et discrète, tu m'a souris, m'a parlé, puis m'a offert cette jolie tasse à café personnalisée et m'a initié aux délicieuses pauses café autours de douceurs que tu as toujours su nous préparer.

Je remercie également Laury Perriaud pour sa gentillesse, son écoute et sa joie de vivre, avec toi j'ai tout appris de la culture Lyonnaise et j'ai bien compris que Lyon will always be the place to be !

Je tiens également à remercier Charlotte Sagne dernière arrivée à l'U612 et première partie. Il m'a été bien difficile de te dire au revoir, je garderai un très bon souvenir des moments que l'on a pu passer ensemble et de cette très belle amitié que l'on a pu nouer.

Je remercie également le Dr Vincent Favaudon, qui m'aura appris qu'en radiobiologie le vin rouge était tout d'abord radioprotecteur !

Je remercie aussi le Dr Frédérique Megnin-Chanet, le Dr Mohammed Tayyib Boudra, le Dr Anne Reynaud, le Dr Patricia Duchambon, Amélie Schellenbauer, Alexis Fouquin, Charles Fouillade, Sandrine Bourgeois et tous ceux qui ont su faire de l'U612 un endroit où il fait toujours bon d'y travailler, dans la bonne humeur, et autours de bonnes choses à déguster. Merci à vous tous qui avez été une vraie famille de cœur tout au long de ces quatre années. Ce fut un plaisir au quotidien de travailler avec vous tous ! Vous me manquerez tous beaucoup.

J'en arrive enfin aux amis et à la famille !

Ma Ryma ! Que serait la vie à Paris sans toi ! Merci d'avoir été toujours là, pour écouter mes histoires de thésarde en galère, de m'avoir soutenu et d'avoir su trouver les mots juste pour me faire sourire en toutes circonstances.

Merci à toute mon équipe de Bougiotes Parisiens, c'est officiel, la thèse est finie et je ne dirai plus jamais non à vos sorties organisées, merci à tous de rendre notre vie Parisienne toujours joyeuses et conviviale.

Un grand merci à tonton Mustapha et tata Fetta, vous m'avez accueilli et aimé comme votre fille, je vous serai à jamais reconnaissante, merci à vous pour tout le soutien que vous avez su m'apporter depuis le début de cette aventure et pour tout le reste aussi.

Merci à Papa, Maman, Mehdi et Lina, m'éloigner de vous quatre a été la plus douloureuse des choses que j'ai eu à faire dans ma vie, vous avez dévié le court de ma destinée, vous m'avez poussé à aller plus loin que tous ce que j'aurai pu espérer, vous avez cru en moi, quand moi j'ai douté, cette thèse j'y arrive enfin au bout grâce à vous et pour vous, pour que tous ce temps passé loin de vous ne soit pas en vain.

Enfin je remercie mon mari qui au jour le jour à dû supporter mes sauts d'humeurs, mes craintes, mes manipes ratées, mes longues journées, et qui en cette fin de thèse a aussi eu droit à la longue étape de la rédaction, tu as vécu cette thèse aussi intensément que moi, tu as cru en moi, m'a conseillé, soutenu sans aucune faille tout au long de cette expérience, et tu auras compris bien plus de choses sur Cdk5 que moi sur tes histoires de collages et de MEMS! Il est aujourd'hui tant pour nous de tourner la page des histoires de thèses et d'écrire des pages bien plus belles de ce livre que j'espère éternel.

Merci à tous les autres membres de ma famille,
Merci à tous ceux que j'oublie de citer...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
<i>Chapitre 1 : Contrôle du cycle cellulaire et maintien de l'intégrité génomique</i>	<i>1</i>
1. Le cycle cellulaire	1
1.1 Régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/Cdks	2
1.2 La transition G1/S	2
1.3 La transition G2/M	3
1.4 La réplication chez les eucaryotes	5
1.4.1 L'initiation de la réplication chez les eucaryotes	5
1.4.1.1 La formation du complexe pré-réplicatif (pré-RC)	6
1.4.2 Initiation de la réplication et activation des kinases en phase S	7
1.4.3 Chargement des polymérases répliquatives et élongation	8
1.4.4 Importance de la régulation de la réplication	9
1.4.4.1 La régulation de l'expression de Cdt1	9
1.4.4.2 La régulation de l'activité kinase	9
2. Les sources de stress génotoxiques	10
2.1 Les rayonnements ionisants	10
2.1.1 Définitions	10
2.1.2 Effets cellulaires des RI et conséquences biologiques	10
2.1.3 Radiosensibilité et cycle cellulaire	14
2.2 Le stress répliatif	14
2.2.1 Définition du stress répliatif	14
2.2.2 Les différentes causes de stress répliatif	15
2.2.2.1 Les obstacles naturels de la fourche de réplication	15
2.2.2.2 Importance de l'équilibre du pool de dNTPs	16
2.2.2.2.1 Les voies de synthèse des dNTPs	16
2.2.2.2.2 Régulation de la RNR	18
2.2.3 Les drogues induisant des stress répliatif	18
3. Les points de contrôles du cycle cellulaire en réponse aux stress génotoxiques	19
3.1 La signalisation des dommages et l'activation des points de contrôles	19
3.2 Le point de contrôle intra-S	21
3.2.1 La voie ATR dépendante	21
3.2.1.1 La reconnaissance de l'ADN simple brin: rôle de la protéine RPA	21
3.2.1.2 Les protéines cibles d'ATR	22
3.2.1.3 Conséquences de l'activation de Chk1 :	23

3.2.1.3.1	La stabilisation de la fourche de réplication	23
3.2.1.3.2	La répression des origines tardives	24
3.2.1.3.3	L'inhibition de la progression en phase S	24
3.2.2	La voie ATM dépendante	25
3.3	Le point de contrôle G2/M	26
4.	Introduction aux mécanismes de réparation des CDBs	28
4.1	Les modifications chromatinienne autour du dommage	29
4.2	La reconnaissance et la signalisation du dommage	29
4.2.1	Le complexe MRN	30
4.2.2	La cascade de signalisation : les effecteurs	31
4.3	Choix du mécanisme de réparation : La balance HR/NHEJ- BRCA1/53BP1	32
4.4	Les différents mécanismes de réparation des CDBs	33
4.4.1	La résection	33
4.4.2	La recombinaison homologue	34
4.4.3	Mécanisme de réparation des CDBs par «Single Strand annealing » (SSA)	35
4.4.4	La réparation par Jonction d'Extrémités Non Homologues (NHEJ)	36
4.4.5	La réparation par NHEJ alternatif (Alt-NHEJ)	37
4.5	Spécificités de la réparation liée à la fourche de réplication	38
4.5.1	Blocages de fourches et CDBs dues à l'hydroxyurée	38
4.5.2	Prise en charge des cassures induites à la fourche	39
4.5.3	Le redémarrage de la fourche de réplication	40
5.	RPA : une protéine multifonctionnelle essentielle au maintien de l'intégrité du génome	40
5.1	Structure et fonctions	40
5.2	Rôles de la protéine RPA	42
5.2.1	Régulation de la protéine RPA et impact sur ses différentes fonctions	44
Chapitre 2 : La kinase dépendante des cyclines-5 : Cdk5		47
1.	La famille des Cdks	47
2.	Fonctions générales des Cdks	47
3.	Cdk5 une Cdk particulière	49
3.1	Structure de Cdk5	50
3.2	Activation de Cdk5	51
3.2.1	Les protéines p35 et p39	51
3.2.2	La protéine p25	52
3.2.3	Autres partenaires de Cdk5	52
3.2.4	Régulation de l'activation de Cdk5	53

3.2.4.1 Régulation post traductionnelles de Cdk5 et p35	54
3.3 Rôles de Cdk5	54
3.3.1 Rôle pro et anti-apoptotique dans les neurones	54
3.3.2 Conséquences pathologiques du dérèglement de l'activité Cdk5 dans les neurones	56
3.3.3 Rôles de Cdk5 dans les cellules non neuronales	56
Chapitre 3 : Cdk5 et cancer	59
1. Les évènements cellulaires impliqués dans le développement tumoral	59
2. Impact des variations de l'expression de Cdk5 sur le développement tumoral :	60
2.1 Dans le cancer du pancréas :	60
2.2 Dans le cancer de la prostate :	60
3.3.4 Dans le cancer de la thyroïde :	61
3.3.5 Dans le cancer du poumon :	61
3.3.6 Dans le cancer du sein :	62
3.4 Le développement d'inhibiteurs de Cdk5 :	62
3.4.1 Les inhibiteurs en essais cliniques :	63
3.4.1.1 La roscovitine:	63
3.4.1.2 Le Dinaciclib (SCH727665)	64
3.4.1.3 AT7519:	64
3.4.1.4 PHA-848125:	65
3.4.1.5 Les 4-Aminoimidazol : vers un inhibiteur spécifique de Cdk5 ?	65
3.5 La thérapie ciblée : une autre manière d'aborder le traitement	66
JUSTIFICATION DES TRAVAUX DE THESE	69
RESULTATS	75
1. Article	76
2. Supplementary materials and figures	107
3. Résultats complémentaires	118
3.3 Les lignées HeLa Cdk5 KD présentent un point de contrôle G2/M altéré	120
DISCUSSION	131
1. Cdk5 : une protéine nécessaire à la croissance et à la survie cellulaire	134
2. Cdk5 favorise la progression des fourches de réplication	135
3. L'absence de Cdk5 affecte le point de contrôle en phase S	138
4. Cdk5 est nécessaire pour la survie aux agents génotoxiques : lien avec la réparation ?	142
5. Cdk5 facteur de pronostic dans le cancer du sein	145
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	149

MATERIELS ET METHODES	155
ANNEXES	167
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	223

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des complexes Cyclines/Cdks au cours du cycle cellulaire	4
Figure 2 : Chargement du Pré-RC sur les origines potentielles	7
Figure 3: Initiation de la réplication	9
Figure 4: Effet de l'exposition d'un système biologique aux RI au cours du temps.....	11
Figure 5: Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des RI.....	13
Figure 6: Les voies de synthèse des dNTPs.....	17
Figure 7: Les différents points de contrôle chez les mammifères	20
Figure 8: Diagramme schématique du point de contrôle en phase S	21
Figure 9: Activation du point de contrôle de réplication	24
Figure 10: Implication des voies ATM et ATR dans la signalisation du dommage	26
Figure 11 : Organisation moléculaire du point de contrôle G2/M.....	28
Figure 12: Représentation schématique des mécanismes de réparation des CDBs	31
Figure 13: Modèle des voies de réparation en G1, S-G2.....	33
Figure 14: Les étapes de la réparation par recombinaison homologue	35
Figure 15: Mécanismes de réparation des CDBs par « Single Strand Annealing ».....	36
Figure 16: La réparation par jonction non homologue classique (C-NHEJ) et alternatif (Alt-NHEJ)	37
Figure 17: Représentation des différents domaines de la protéine RPA	41
Figure 18: Les différentes fonctions de la protéine RPA	43
Figure 19: Modèle de la phosphorylation de la protéine RPA en réponse à la CPT et impact en <i>cis</i> et en <i>trans</i>	46
Figure 20: Sites prédictifs des Cdks et des protéines Cdks Like	48
Figure 21: Interaction des Cdks avec les cyclines et « cyclines like proteins » (Bruyere and Meijer, 2013).	50
Figure 22: Structure de la kinase Cdk5 lié à p25 (Tarricone et al., 2001)	51
Figure 23: Principe génétique de la létalité synthétique	67
Figure 24: Différents modèles expliquant la létalité synthétique BRCA1/PARP1	68
Figure 25: Les effets de la déplétion de Cdk5 sur l'activité de PARP-1 et le recrutement de PARP-1, XRCC1 et PCNA, conséquences sur le SSBR.	72
Figure 26: Modèle représentatif des modes d'actions de Cdk5 au niveau de la fourche de réplication.....	117
Figure 27 : Caractérisation des lignées HeLa Contrôles (CTRL et shCTRL) et Cdk5 KD (Cdk5-1499 et Cdk5-1500)	119
Figure 28: Déficience du checkpoint en phase S post irradiation.....	120
Figure 29 : Altération du point de contrôle G2/M post irradiation	121
Figure 30 : activation des cascades de signalisation ATM et ATR dépendantes post irradiation ...	122

Figure 31: Survie clonogénique des lignées HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD à des doses croissantes de rayonnements gamma, asynchrones et après une synchronisation en phase S	123
Figure 32: Activation des cascades de signalisation ATM et ATR dépendantes post irradiation en phase S.....	124
Figure 33: Survie clonogénique des lignées HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD traitées avec des inhibiteurs de PI3K.....	125
Figure 34: Survie clonogénique des lignées HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD après irradiation en présence de l'inhibiteur de DNA-PK NU7441.....	126
Figure 35 Survie clonogénique des lignées HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD à l'inhibiteur de DNA-PK associé aux HU	127
Figure 36: Modèle proposant les effets de la déplétion de Cdk5 sur la survie cellulaire (modifiée à partir de (Patel et al., 2011))	129
Figure 37: Modèle expliquant la sensibilité des lignées Cdk5 KD au stress génotoxique	145
Figure 38: Survie clonogénique des lignées HeLa, U2OS et des lignées BC après inhibition de Cdk5	169
Figure 39: Effet de l'inhibition de Cdk5 sur le pool de nucléotide.....	170
Figure 40: Effet de l'inhibition de Cdk5 sur le pool de nucléotide en présence de HU	170
Figure 41: Quantification des foyers 53BP1 et Rad51 dans les lignées HeLa Contrôles et Cdk5 KD en absence de traitement	171

ABBREVIATIONS

APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
APE1	Apurinic/apyrimidinic Endonuclease
APH	Aphidicoline
ARS	Autonomous Replication Sequence
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine Tri Phosphate
ATR	ATM and Rad3 related protein kinase
BER	Base Excision Repair (Réparation par excision de base)
BIR	Break-Induced Replication
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like.
BRCA	Breast Cancer
BrdU	5-bromodéoxyuridine
CAK	Cdk Activating Kinase
CDB	Cassure double brin
CDC	Cell Division Cycle
Cdk	Cyclin dependent kinase
Cdt1	Chromatin licensing and DNA replication factor 1
Chk	Checkpoint kinase
CIP	CDK interacting protein
CKI	Cyclin dependent kinase inhibitor
CldU	Chloro-désoxy-uridine
CMG	Cdc45-MCM-GINS
CPT	Camptothécine
CTD	Carboxy terminal domain
DBD	DNA Binding domain
dCK	déoxycytidine kinase
DDK	Dbf4-dependent kinase Cdc7
dNs	déoxyribonucléosides
dNTPs	déoxyribonucléotides triphosphates
E2F	E2 recognition Factor
EBV	Epstein Barr Virus
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FEN1	Flap EndoNuclease-1
GINS	go-ichi-ni-san

HDAC	Histone désacétylase
HeLa	Henrietta Lacks
HR	Homologous Recombination (Recombinaison Homologue)
HU	Hydroxurée
IC	Complexe d'Initiation
INK	Inhibitor of CDK
KAP	KRAB-associated protein 1
KIP	Kinase inhibitory protein
MCM	Mini Chromosome Maintenance
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MFS	Metastasis-free survival
MMEJ	Microhomology-mediated end joining
MMS	Methyl methanesulfonate
MPF	Meiosis Promoting Factor
MPP	1-méthyl-4-phényl pyridinium
MRN	Mre Rad50 Nbs1
NCS	Néocarcinostatine
NDP	ribonucléosides diphosphates
NER	Nucleotide Excision Repair (réparation par excision de nucléotide)
NHEJ	Non Homologous End Joining (reparation par suture non homologue)
NSCLC	Non-Small cell lung cancer
OB fold	Oligo-saccharide/oligo nucléotide Binding fold
Orc	Origin Recognition Complex
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymérase
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PLK	Polo Like Kinase
PNKP	Polynucleotides Kinase-Phosphate
PP2A	Protein Phosphatase 2
ROS	Reactive Oxygen Species
Rb	Rétinoblastome
RDS	Radioresistant DNA Synthesis
RFB	Replication Fork Barriers
RFC	Replicating Factor C
RI	Rayonnements Ionisants
RNF	Ring Finger Protein

RNR	Ribonucléotide reductase
RPA	Replication Protein A
SCE	Sister Chromatide Exchange
SMC	Structural maintenance of chromosomes
SSA	Single Strand Annealing
STAT3	Signal transducer and Activator of Transcription 3
shRNA	RNA short hairpin
ssDNA	single strand DNA
TK	Thymidine kinase
TMPK	Thymidilate kinase
TS	Thymidilate synthase
U2OS	Human Osteosarcoma Epithelial Cells
UVA	Ultra Violet A
WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase
XLF	XRCC4-like factor
XRCC	X-ray repair cross-complementing protein 1



INTRODUCTION

Chapitre 1 : Contrôle du cycle cellulaire et maintien de l'intégrité génomique

1. Le cycle cellulaire

« Start », c'est ainsi que Lee Hartwell décide en 1974 d'appeler tous les événements initiateurs du cycle cellulaire, régulés par de nombreux gènes identifiés grâce à de nouveaux mutants qu'il vient d'isoler chez la levure *S. cerevisiae*, baptisés gènes du cycle de division (CDC) (Hartwell et al., 1974). Parmi ces gènes, il accorde une importance fondamentale à *CDC28* qu'il décrit comme contrôlant la première et primordiale étape du cycle cellulaire, initiatrice de la division (Hartwell, 2002). Un an plus tard, Paul Nurse découvre les mutants *wee* chez *S. pombe*, qui contrôlent la mitose, notamment *wee2* qu'il identifiera comme correspondant à *cdc2*, homologue de *cdc28*. En 1984, il prouva à ses collègues travaillant sur des modèles de mammifères que les levures étaient bien plus qu'une petite nuisance pouvant infecter leurs cellules, en identifiant la première kinase dépendante des cyclines (Cdk), Cdk1, « the human *cdc2* », suggérant que tous les eucaryotes seraient contrôlés par un cycle cellulaire commun. Comme leur nom l'indique, les Cdk dépendent des cyclines, encore inconnues du temps de ces découvertes ; c'est en juillet 1982 que Tim Hunt découvre les cyclines dans des œufs d'oursins. Enfin la notion du MPF (Meiosis Promoting Factor) sera introduite et quelques années plus tard on comprendra que le MPF n'est autre que le complexe Cycline/Cdk (Hunt, 2002). Leland Hartwell, Paul Nurse et Tim Hunt recevront en 2001 le prix Nobel de physiologie et de médecine pour l'ensemble de ces découvertes et ouvriront la porte à bien d'autres questions ...

Le cycle cellulaire représente l'ensemble des étapes permettant à une cellule de se diviser pour donner deux cellules filles génétiquement identiques. Ce mécanisme est hautement régulé et conservé chez les eucaryotes. Afin d'aboutir à une division, la cellule mère passe par différentes phases. Ce processus peut être divisé en deux étapes : l'interphase qui permet à la cellule de se préparer à la division et l'étape ultime de division, la mitose, durant laquelle la cellule donne naissance à deux cellules filles. L'interphase est subdivisée en trois phases : G1 (Gap 1), S (Synthèse) et G2 (Gap 2). La phase G1 est la plus longue, elle va permettre à la cellule de synthétiser des protéines, répliquer les organelles, et se préparer à la mitose. Elle sera suivie de la phase de synthèse qui est probablement la plus complexe puisqu'elle permet la réplication du génome de façon extrêmement coordonnée (chez les mammifères la durée de

cette étape varie de 6 à 10 heures), et enfin la phase G2 qui permet à la cellule d'entrer en Mitose. L'étape mitotique se subdivise en quatre phases : la prophase (condensation des chromosomes), la métaphase (alignements des chromosomes), l'anaphase (ségrégation des chromosomes) et enfin la télophase (décondensation et cytokinèse).

1.1 Régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/Cdks

La progression dans le cycle cellulaire requiert l'activation des Cdks. Ces protéines sont une famille de serines thréonines kinases qui phosphorylent leurs cibles de manière coordonnée. En absence des cyclines (protéines activatrices des kinases), les Cdks sont inhibées par leurs interactions avec les protéines des familles des CKI (cyclin dependent kinase inhibitor) constitué de deux groupes les CIP/KIP (Cdk interacting protein/Kinase inhibitory protein) et les INK (Inhibitor of Cdk). C'est l'oscillation de l'expression des cyclines qui va permettre d'activer les Cdks de façon temporelle et précise. Il existe différentes familles de Cyclines et de Cdks qui interagissent de manière spécifique en fonction de la phase du cycle cellulaire. Ces interactions sont au cœur des transitions permettant la division cellulaire (**Figure 1**). Ces mêmes complexes Cyclines/Cdks peuvent, en cas de stress génotoxique, devenir la cible de protéines de contrôle, qui, par des modifications post traductionnelles inhibent les complexes cyclines/Cdks et activent les points de contrôle du cycle cellulaire, ce qui permet d'arrêter momentanément la progression dans le cycle cellulaire.

1.2 La transition G1/S

Durant la phase G1, deux classes de cyclines opèrent : les cyclines D (D1, D2, D3) et les cyclines E (E1, E2), elles interagissent spécifiquement avec trois Cdks : Cdk4, Cdk6 pour les Cyclines D et Cdk2 pour les Cyclines E (Coqueret, 2002). En réponse à des stimuli tels que les facteurs de croissance, l'expression de la cycline D augmente en début de G1, ceci permet la formation des complexes Cycline D/Cdk4 et Cycline D/Cdk6, et un changement de conformation des Cdks qui conduit à leur phosphorylation par la kinase activatrice CAK (Cdk Activating Kinase) (Lolli and Johnson, 2005). Les complexes Cyclines D/Cdks activés vont cibler la protéine Rb (Rétinoblastome) dont le rôle est d'inhiber les facteurs de transcription de la famille des E2F. La phosphorylation de la protéine Rb par les Cdks au niveau de 13 sites consensus *in vivo* entraîne un changement de conformation qui libère le complexe E2F/DP (Dick and Rubin, 2013), entraînant l'expression des gènes d'initiation de la réplication notamment l'ADN polymérase, la Cycline E et la Cycline A (Bracken et al., 2004; Khanna, 2009). Il est à noter que l'expression de la Cycline E a été observée en l'absence d'une activité E2F, de plus E2F ne peut induire la progression en phase S en absence de l'expression

de la Cycline E, suggérant que la cycline E est un effecteur du facteur E2F mais aussi un de ces activateurs (Coqueret, 2002). L'expression de la cycline E et sa stabilisation vont permettre son interaction avec Cdk2. Le complexe Cycline E/Cdk2 catalyse un certain nombre de réactions, notamment une hyperphosphorylation de la protéine Rb (Khanna, 2009; Narasimha et al., 2014), qui va agir telle une boucle positive activant E2F ; ceci ne sera possible qu'après déphosphorylation des sites Thr14 et Tyr15 de Cdk2 par Cdc25A. E2F est également un facteur de transcription de la protéine Cdc25A, le complexe CyclineE/Cdk2 initie en fin de G1 la réplication *via* la phosphorylation du complexe pré réplcatif (pré-RC) et l'enchaînement d'évènements de réplication qui sont détaillés dans le paragraphe suivant (Jones and Petermann, 2012). A la fin de la phase G1, Cdk2 phosphoryle la cycline E entraînant sa dégradation par le protéasome et la cycline A interagit avec Cdk2, ce qui permet l'entrée en phase S.

Il est à noter qu'un nouveau modèle précise le modèle précédent, ce dernier se base sur des études qui montrent qu'en présence des complexes Cycline D/Cdks la protéine Rb est encore active et inhibe E2F (Ezhevsky et al., 2001; Ezhevsky et al., 1997; Haberichter et al., 2007). Narasimha *et al.* ont montré que la protéine Rb est seulement mono-phosphorylée en présence du complexe CyclineD-Cdk4/6 et que cette phosphorylation est nécessaire mais pas suffisante pour la dissociation du complexe Rb-E2F, ce n'est qu'après son hyperphosphorylation CyclineE/Cdk2 dépendante que la protéine Rb est inhibée et E2F activé (Narasimha et al., 2014).

1.3 La transition G2/M

Le complexe Cycline B/Cdk1 gouverne la transition G2/M. C'est en G2 que la cycline B, faiblement exprimée jusque-là, est phosphorylée par la kinase PLK1 (Polo Like Kinase 1), permettant sa relocalisation dans le noyau (Toyoshima-Morimoto et al., 2001; Yuan et al., 2002) De plus la relocalisation du complexe CyclineA/Cdk1 au niveau du centrosome en fin de G2 augmentera également la translocation de la Cycline B au niveau du cytoplasme (De Boer et al., 2008), et durant la prométaphase, le complexe APC/C (Anaphase Promoting Complex Cyclosome) dégrade la Cycline A, ce qui stabilise la Cycline B (Gong and Ferrell, 2010). L'interaction du complexe Cycline B/Cdk1 active Cdk1, cette activité sera amplifiée par la phosphorylation, CAK dépendante, de Cdk1 sur la Thr-161. Afin d'optimiser l'activité du complexe Cycline B/Cdk1, la protéine PLK1 active également Cdc25 « activateur du complexe » et inhibe wee1 et Myt1 « inhibiteurs du complexe » (Zitouni et al., 2014). Cdc25 déphosphoryle ainsi les sites Tyr-15 et Thr-14 de Cdk1, et le complexe Cycline B/Cdk1

atteint son maximum d'activation en métaphase. L'activité de Cycline B/Cdk1 est de plus régulé par un double mécanisme de rétrocontrôle car le complexe activé augmente l'activité de Cdc25, et inhibe l'activité de Wee1. Le complexe Cycline B/Cdk1 contribue à la condensation et à l'alignement des chromosomes, lorsque les microtubules sont correctement attachés aux kinétochores, le complexe APC/C initie la polyubiquitination et la dégradation de plusieurs protéines, notamment la Cycline B1, permettant de finaliser la mitose (Pines, 2006).

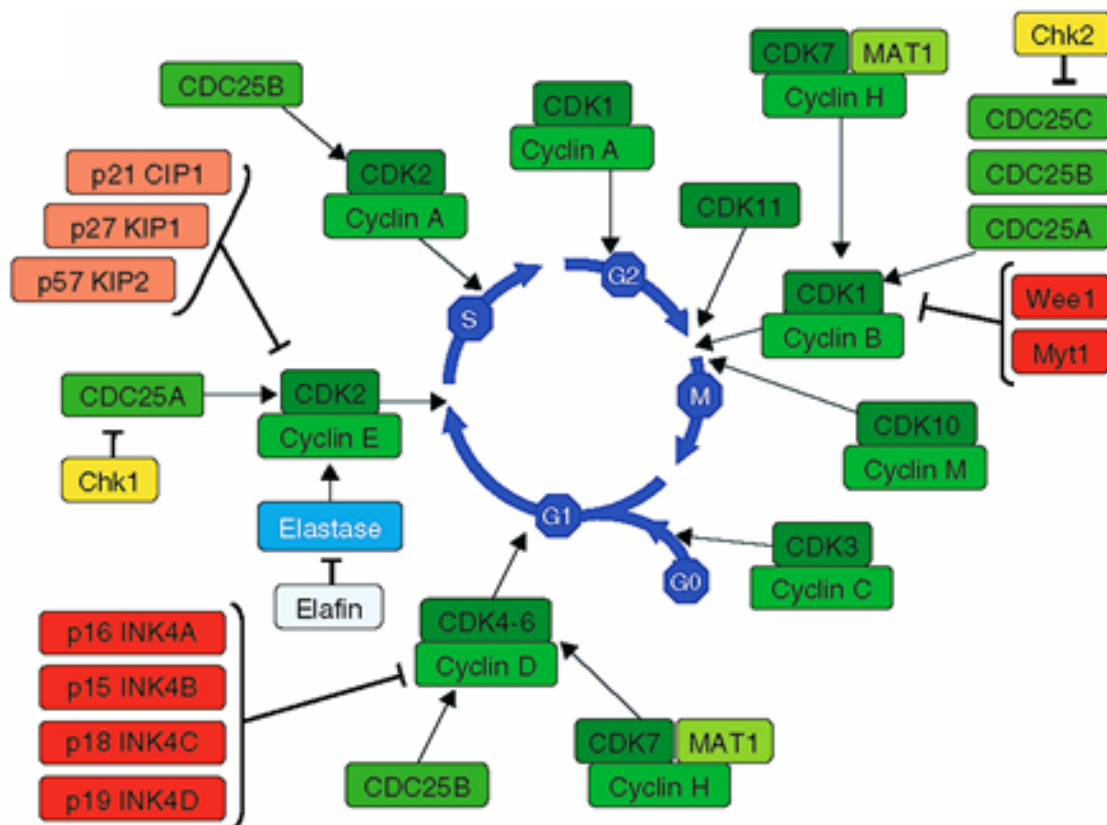


Figure 1 : Représentation des complexes Cyclines/Cdks au cours du cycle cellulaire

Les complexes Cyclines/Cdks contrôlent les transitions d'une phase à l'autre du cycle cellulaire, ces complexes sont régulés en amont par des kinases et des phosphatases (Bruyere and Meijer, 2013).

1.4 La réplication chez les eucaryotes

La réplication de l'ADN permet la duplication de l'information génétique d'une cellule. L'initiation de la synthèse se fait de manière spatiotemporelle et coordonne l'activation de plusieurs milliers d'origines de réplication le long du chromosome. Elle prend place dans la cellule parallèlement à d'autres mécanismes tels que la transcription et le remodelage de la chromatine, il est ainsi essentiel que la réplication soit finement régulée.

Ce processus est extrêmement robuste, s'appuyant sur plusieurs paramètres : 1) tout d'abord la fidélité, grâce aux polymérases et aux systèmes de vérification qui s'y associent, tel que le MMR (mismatch repair) ; 2) ensuite, la coordination des événements, puisque les origines de réplication ne seront activées qu'une seule fois par cycle cellulaire, même si le génome possède un large excès de pre-RCs, assemblés avant la phase S, seules certaines d'entre elles seront activées ; 3) enfin, la progression de la réplication se fait en présence de plusieurs facteurs réplicatifs qui stabilisent le réplisome et permettent de faire face aux obstacles (Magdalou et al., 2014).

Au début de chaque division cellulaire, la totalité du matériel génétique doit être dupliquée sans erreur. Cette étape dépend de la mise en place des origines de réplication qui sont de l'ordre de 30.000 à 50.000 chez l'Homme. Plusieurs de ces origines seront initiées au cours d'un cycle de synthèse grâce aux protéines d'initiation qui permettent l'établissement d'une fourche de réplication et le recrutement des enzymes nécessaires à l'ouverture de l'ADN et à sa synthèse (Leonard and Mechali, 2013). A la fin de la réplication, une copie du génome sera transmise à chacune des cellules filles, qui posséderont un brin parental et un brin néosynthétisé. Ce mécanisme est conservé chez les procaryotes et les eucaryotes et est défini comme étant semi-conservatif, la double hélice d'ADN s'ouvre au cours de la réplication et permet la duplication des deux brins parentaux en formant la fourche de réplication.

La réplication peut être scindée en deux étapes distinctes : l'initiation qui détermine les loci chromosomiques où les fourches seront mises en place et l'élongation qui va permettre de synthétiser l'ADN de manière bidirectionnelle par rapport à la position d'initiation.

1.4.1 L'initiation de la réplication chez les eucaryotes

L'initiation de la réplication se fait en deux étapes, tout d'abord la formation du complexe pré-réplicatif (pré-RC) au niveau des origines de réplication choisies en G1 ; ensuite l'activation de ce complexe au cours de la phase S par le biais de diverses phosphorylations (**Figure 3**) (Tuduri et al., 2010).

1.4.1.1 La formation du complexe pré-réplicatif (pré-RC)

Contrairement aux procaryotes qui initient leur réplication au niveau d'un seul site, les eucaryotes possèdent plusieurs sites d'initiation appelés origines de réplication, ces origines sont reconnues par les complexes ORC (Origin Recognition Complex) qui sont composés de six sous unités, Orc1-Orc6, possédant des motifs qui facilitent leur association à l'ADN (DNA binding motifs). Chez certains eucaryotes tels que *S.cerevisiae*, une séquence spécifique des origines a été identifiée (ARS « autonomous replication sequence »). En revanche aucune séquence consensus n'a été mise en évidence chez les eucaryotes supérieurs. Chez l'Homme, il a été montré que plus de la moitié des origines étaient situées à proximité d'îlots CpG, et également à proximité de sites de liaison des facteurs de transcription c-jun et c-fos (Cadoret et al., 2008).

La fixation des Orc au niveau des origines nécessite une hydrolyse d'ATP qui permet des changements de conformation, activant l'initiation de la réplication (Leman and Noguchi, 2013; Scholefield et al., 2011). L'assemblage des Orc est régulé : afin d'éviter la re-réplication, cet assemblage ne se fait qu'après la mitose ; dans les cellules humaines, il a lieu à la transition M-G1, de plus, Orc1 est dégradé au cours de la phase S et re-synthétisé durant la transition M-G1 qui suit (Saha et al., 2006). En fin de Mitose et début de G1 les protéines Cdt1 (Chromatin licensing and DNA replication factor 1) et Cdc6 (Cell division cycle protein 6) s'associent aux Orc et permettent le recrutement du complexe hexamérique MCM2-7 (simplifié en MCM pour Mini Chromosome Maintenance). Le complexe pré-RC est maintenant formé. Ce complexe ne se forme qu'en début de G1 lorsque l'activité du complexe APC/C (Anaphase Promoting Complex or Cyclosome) est élevée, car elle dégrade les cyclines des phases S et G2/M. Lorsque les cyclines de la phase G1 sont exprimées, l'activité des Cdks de G1 augmente, ce qui permet d'inhiber l'activité APC/C par la phosphorylation de la protéine adaptatrice du complexe « Cdh1 ». Les Cyclines de phase S peuvent alors être exprimées et permettre l'initiation de la réplication (Siddiqui et al., 2013).

Comme nous l'avons évoqué, plusieurs complexes Orc sont formés et s'associent aux origines de réplication à la transition M/G1. Cependant, un complexe pré-RC n'est pas systématiquement initié, c'est ce qui est défini comme des origines dormantes, elles se révèlent d'une extrême importance en cas de ralentissement ou de blocage de la fourche. En effet, elles permettent l'initiation d'évènements de réplication à proximité de la fourche bloquée en quelques minutes. Ces origines dormantes seraient sous le contrôle de protéines impliquées dans l'activation du point de contrôle de la réplication telles que ATR et Chk1

dont l'absence engendre une augmentation du nombre d'origines initiées en phase S (Masai et al., 2010).

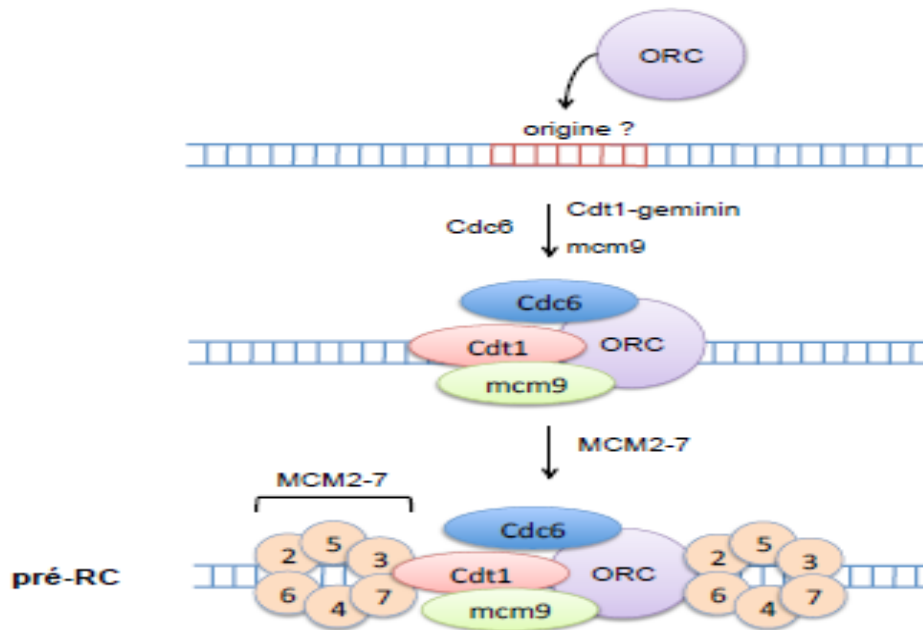


Figure 2 : Chargement du Pré-RC sur les origines potentielles

L'origine, dont on ignore la nature chez les mammifères, est reconnue par l'hétéro-hexamère ORC1-6. Le complexe Orc est reconnu par Cdt1 et Cdc6. Mcm9 intervient dans le chargement de l'hétéro-hexamère MCM2-7. Deux complexes MCM sont associés à l'Orc. Le complexe de pré-réplication est assemblé en G1 (modifié à partir de (Mechali, 2010)).

1.4.2 Initiation de la réplication et activation des kinases en phase S

La maturation du complexe de Pré-Réplication en complexe d'initiation (IC) n'a lieu qu'à la transition G1-S. Deux types de complexes protéiques, le complexe DDK (Dbf4-dependent kinase Cdc7) et les complexes Cycline A ou E associé à Cdk2, vont permettre le recrutement de facteurs activateurs du pré-RC, les co-activateurs de l'hélicase MCM qui sont Cdc45 et GINS (go-ichi-ni-san). Les cibles de ces kinases sont encore mal connues, chez la levure il a été montré que les Cdks de la phase S étaient requises pour la phosphorylation des facteurs Sld2 et Sld3 nécessaires au recrutement de Cdc45 et GINS et à l'initiation de la réplication. En revanche, le rôle de leur orthologue respectif chez les métazoaires, RecQ4 et Treslin/Ticrr, fait encore l'objet d'études. Il a par exemple été récemment montré que Treslin interagissait avec TopBP1 de façon Cdk2 dépendante et que cette interaction était nécessaire pour le recrutement de Cdc45 (Kumagai et al., 2010; Masai et al., 2010; Masumoto et al., 2002; Sanchez-Pulido et al., 2010).

Le complexe DDK activé est recruté par MCM au niveau du réplisome, il favorise le recrutement de Cdc45 via la phosphorylation de plusieurs sous unités de MCM, avec une préférence pour la sous unité MCM2 (Jones and Petermann, 2012; Masai et al., 2010). Il a été montré *in vitro* que ces phosphorylations seraient fortement stimulées par des phosphorylations initiatrices Cdk dépendantes (Masai et al., 2000). Le complexe GINS s'associe au complexe MCM et est requis pour la stabilité de Cdc45 sur le brin naissant (Depamphilis et al., 2012), c'est ainsi que le complexe CMG (Cdc45-MCM-GINS) est formé, il possède une activité hélicase permettant la mise en place de la fourche de réplication.

1.4.3 Chargement des polymérases répliquatives et élongation

Une fois le complexe d'initiation formé, la réplication nécessitera l'ouverture de la double hélice et le recrutement des polymérases répliquatives (Pol α , δ et ϵ). Les protéines Cdc45 et GINS initient un réarrangement conformationnel qui va permettre aux deux complexes CMG de se séparer afin de permettre l'ouverture de double chaîne d'ADN et la formation de la fourche de réplication. La protéine MCM10 semble également essentielle à cette étape de l'initiation puisqu'elle interagit avec les différents composants du réplisome, notamment Cdc45, MCM2-7, GINS, Orc, et RPA (Replication Protein A) et elle permet la stabilisation de Cdc45 lors de l'ouverture de la double chaîne d'ADN (Thu and Bielinsky, 2014). Ceci va conduire au recrutement de RPA et des polymérases à la fourche. Le complexe enzymatique pol α /primase va permettre la formation d'amorces ARN/ADN qui seront prises en charge par les polymérases δ et ϵ sur les deux brins néoformés. L'association des polymérases avec la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) stabilise leur interaction avec l'ADN. Sur le brin matrice 3'-5', la réplication sera continue, en revanche l'élongation du brin discontinu nécessite la constante initiation de fragments d'Okazaki et le recrutement continu de la protéine PCNA par le complexe RFC (Replicating Factor C). Ces deux facteurs sont également nécessaires pour réguler les « Switch » entre la polymérase α /primase et les polymérases répliquatives, et indispensables pour le recrutement de FEN1 (Flap EndoNuclease-1) et de la Ligase I nécessaires à la jonction des fragments d'Okazaki (Jones and Petermann, 2012; Leman and Noguchi, 2013).

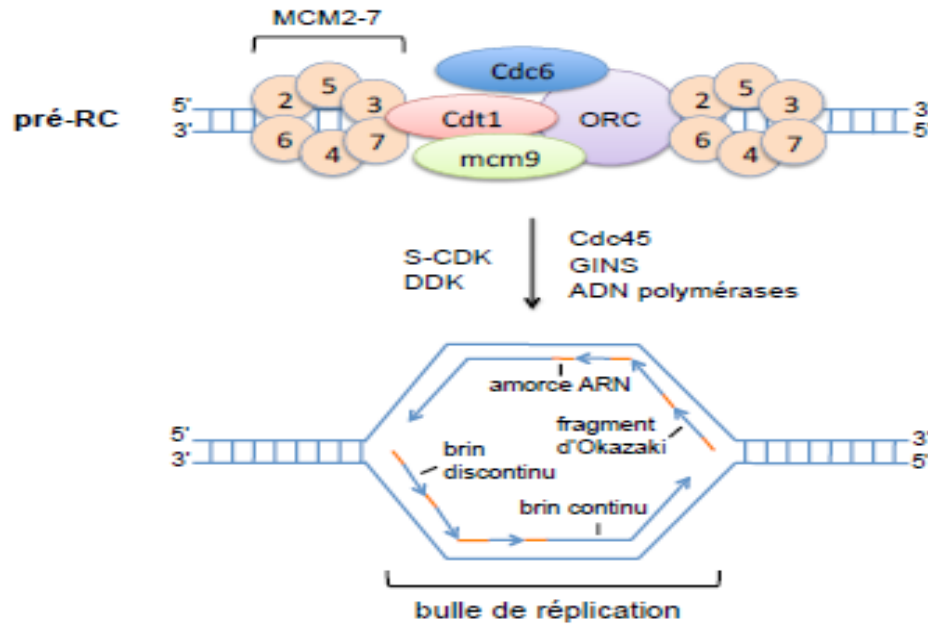


Figure 3: Initiation de la réplication

Le complexe pré-RC est converti en complexe d'initiation (IC) par le recrutement de Cdc45 et GINS qui forment un complexe avec l'hélicase MCM et l'activation du complexe à la transition G1-S suite à l'activation des kinases de la phase S. L'ouverture de l'ADN permet le recrutement des polymérases et l'initiation de la réplication (modifiée à partir de (Mechali, 2010)).

1.4.4 Importance de la régulation de la réplication

Afin de réguler la réplication, notamment pour éviter la réinitiation d'origines de réplication au cours de la phase S, la cellule met en place des mécanismes de contrôle empêchant la formation des complexes pré-RC. Cette régulation se fait à deux niveaux :

1.4.4.1 La régulation de l'expression de Cdt1

Tout d'abord l'augmentation de l'activité kinase en phase S entraîne la phosphorylation de Cdt1 qui sera redirigé vers le protéasome. En parallèle l'action de la Géménine, une protéine dont l'expression augmente de façon inversement proportionnelle à Cdt1 va permettre d'inhiber Cdt1 au cours des phases S et G2 en formant un complexe avec Cdt1, ce qui empêche son interaction avec le complexe MCM. Cette double régulation inhibitrice assure l'absence de Cdt1 en phase S et réduit tout risque de re-réplication (Depamphilis et al., 2012; Masai et al., 2010).

1.4.4.2 La régulation de l'activité kinase

Un autre niveau de régulation concerne l'activité des Cdks, en effet l'augmentation de l'activité Cdk2 en phase S permet de phosphoryler plusieurs cibles notamment Orc1 et Cdc6,

entraînant leur exclusion du noyau. De plus, la phosphorylation des MCM et des Orc empêche le ré-assemblage du complexe pré-RC (Depamphilis et al., 2012; Masai et al., 2010).

2. Les sources de stress génotoxiques

Les cellules sont soumises en permanence à différents stress génotoxiques (stress oxydant, UV, radiations ionisantes (RI)...). Ces stress qui peuvent être endogènes (par exemple liés à des réactions enzymatiques) ou exogènes (facteurs environnementaux ou traitements thérapeutiques) vont endommager l'ADN, ralentir la dynamique de réplication puis bloquer les fourches de réplication, et les mécanismes mis en jeu pour répondre à ces stress peuvent conduire à de l'instabilité génomique. Deux types de stress vont être détaillés par la suite, les RI et le stress réplicatif.

2.1 Les rayonnements ionisants

2.1.1 Définitions

Un rayonnement est défini comme un processus d'émission ou de transmission d'énergie sous la forme d'ondes électromagnétiques ou de particules. Cette énergie peut être absorbée par un atome ou une molécule. Les rayonnements peuvent être ionisants ou non ionisants.

Un rayonnement est dit ionisant lorsqu'il possède une énergie suffisamment importante pour pouvoir arracher un électron aux atomes qui constituent la matière. Cette énergie seuil est de 30 électrons-volts. On distingue deux types de RI : les rayonnements électromagnétiques (Rayons X ou gamma) et les rayonnements particulaires (α et β).

Lorsque l'énergie d'un rayonnement est insuffisante pour engendrer des réactions d'ionisations on parle de rayonnement non ionisant, les plus connus sont les ultra-violets (UV). Ils peuvent toutefois transférer leur énergie au cortège électronique des atomes du milieu pour les amener à un état excité.

2.1.2 Effets cellulaires des RI et conséquences biologiques

L'irradiation d'une cellule génère une succession de processus au cours du temps, divisé en trois phases distinctes (**Figure 4**) : **(1)** la phase physique : durant laquelle a lieu l'interaction entre les particules et l'atome du tissu cible, cette interaction peut être directe, dans ce cas il en résulte une ionisation de la molécule d'intérêt (par exemple une molécule d'ADN). L'effet peut être indirect, dans ce deuxième cas ce sont les produits de la radiolyse de l'eau qui interagissent avec les molécules contenues dans les cellules. L'effet indirect est largement

majoritaire dans les conditions habituelles car les milieux biologiques sont à 70% constitués d'eau; la probabilité que les RI interagissent avec l'eau plutôt qu'avec des macromolécules (comme les molécules d'ADN) est donc beaucoup plus importante. **(2)** la phase chimique : c'est la phase durant laquelle les atomes et molécules endommagés réagissent avec d'autres composants. En effet l'ionisation va générer des radicaux libres tel que les molécules (OH^\bullet), dont la succession de réactions entraîne un endommagement des molécules adjacentes. Les principales cibles biologiques des radicaux issus de la radiolyse de l'eau sont les constituants des acides nucléiques (désoxyribose, bases), les lipides insaturés des membranes cellulaires, et certains acides aminés. Nous nous préoccupons dans ce qui suit uniquement des dommages produits sur les molécules d'ADN. **(3)** la phase biologique : c'est au cours de cette phase que la cellule met en place les mécanismes de réparation de l'ADN, d'apoptose, d'arrêt du cycle cellulaire, dans les cas extrêmes, cette réponse conduit à la cancérogénèse (Albert Van Der Kogel, 2009; Tubiana, 2008).

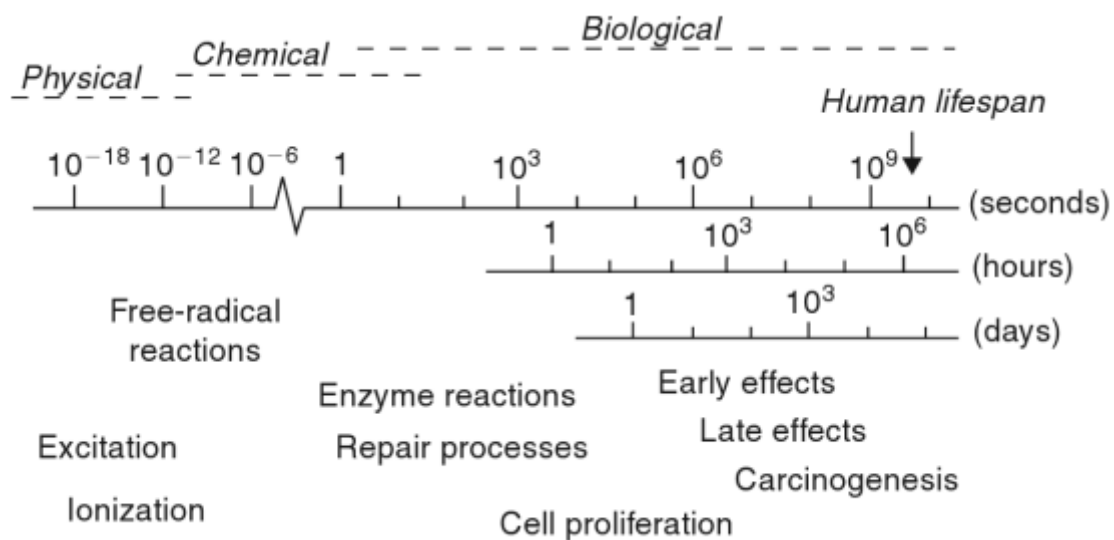


Figure 4: Effet de l'exposition d'un système biologique aux RI au cours du temps

L'irradiation d'un système biologique induit une succession de processus composé de trois phases : la phase physique durant laquelle ont lieu les événements d'ionisation et d'excitation, la phase chimique au cours de laquelle les réactions chimiques se propagent dans la cellule, et la phase biologique qui permet de répondre aux stress générés par les deux phases précédentes (Albert Van Der Kogel, 2009).

Lorsqu'une cellule est exposée à des RI, les protéines, les lipides et l'ADN de la cellule sont endommagés et l'une des premières problématiques ayant été posée en radiobiologie était de comprendre quel était le point critique pour une cellule irradiée. Il est de nos jours établi que ce point critique est incontestablement l'ADN, et que toute modification de la structure de

l'ADN ou des mécanismes de réparation entraîne un stress génotoxique. La réponse des cellules à ces dommages se traduira par :

- l'activation de voies de signalisation modifiant l'expression des gènes ou les propriétés (phosphorylation) d'un grand nombre de protéines ;
- une altération de la progression du cycle cellulaire ;
- des mutations et des aberrations chromosomiques, souvent une aneuploïdie ;
- une modification du phénotype cellulaire ;
- la mort cellulaire (mort clonogénique) ou perte de la capacité proliférative, qui constitue l'effet recherché pour la stérilisation des tumeurs en radiothérapie.

L'ampleur de ces diverses manifestations dépend de la dose de rayonnement absorbée par les cellules cibles, et leurs effets sont échelonnés dans le temps. On peut ainsi distinguer :

- la reconnaissance précoce des dommages (*quelques secondes*) ;
- la signalisation (*quelques minutes*) et la réparation des lésions (*quelques dizaines de minutes*) ;
- l'induction, ou la répression de l'expression de certains gènes (*quelques heures*) ;
- la mort cellulaire (*quelques heures à quelques jours*) ;
- l'instabilité génomique (*quelques jours à plusieurs années*)(Tubiana, 2008).

On peut distinguer différents types de dommages radio induits : les modifications de bases, les cassures simples et double brin et les pontages intra-brin, inter-brin de l'ADN ou ADN-protéine. Chez les mammifères, la fréquence des lésions induites par unité de RI (Gray ou Gy) après une irradiation gamma a été estimée à 850 lésions de type pyrimidine, 450 lésions purine, 1000 cassures simple brin et entre 20 et 40 cassures double brin (CDB) (Cadet et al., 2008; Leatherbarrow et al., 2006). Chaque type de lésion va être réparé par un mécanisme cellulaire spécifique. Le BER est la voie de réparation majoritaire pour la réparation des lésions des bases de l'ADN et est la plus polyvalente puisqu'elle intervient aussi bien dans la réparation des dommages de bases dus à des agents oxydants, alkylants ou de désamination (Kavli et al., 2007; Lindahl, 1993; Sedgwick et al., 2007). De plus, les cassures simple-brin générées par les ROS, les produits dérivés du métabolisme cellulaire ou l'irradiation (X et γ) sont réparées par la voie de réparation des cassures simple-brin (SSBR) qui utilise les protéines du BER et n'en diffère que dans les étapes initiales de reconnaissance des lésions.

En effet, les premières étapes de reconnaissance du dommage et d'élimination des lésions de l'ADN sont spécifiques de chaque voie, alors que les dernières étapes qui impliquent le remplissage de la brèche, et la ligation de l'ADN leur sont communes. Le SSBR commence par la détection des SSBs par des protéines spécifiques parmi lesquelles PARP-1 est celle qui a le plus d'affinité pour ces lésions. Le BER répare les lésions de bases selon deux sous-voies dans les étapes finales : le Short-patch et le Long-patch. Dans les deux cas, l'étape initiale passe par la reconnaissance de la(es) base(s) endommagée(s) qui va déterminer la spécificité de la réparation (Robertson et al., 2009). Les CDB représentent une classe minoritaire de dommages radio induits, cependant la réparation de ce type de cassure est primordiale pour la cellule car une seule CDB peut être létale. Ces dommages peuvent être induits directement par l'effet des radiations, ou être la conséquence d'une conversion d'autres type de dommages tels que les dommages de base ou de sucre qui suite à une accumulation de plusieurs dommage définit comme étant des « lésions complexes », sont pris en charge par le mécanisme de réparation par suture non homologue (NHEJ pour Non Homologous End Joining) (Malyarchuk et al., 2008). La réparation des CDBs par recombinaison homologue (HR) est également importante pour la survie cellulaire, l'inhibition des protéines de réparation des CDB entraine une radio-sensibilisation (Adar et al., 2009; Zafar et al., 2010). Ces différents mécanismes de réparation seront détaillés au paragraphe 4.

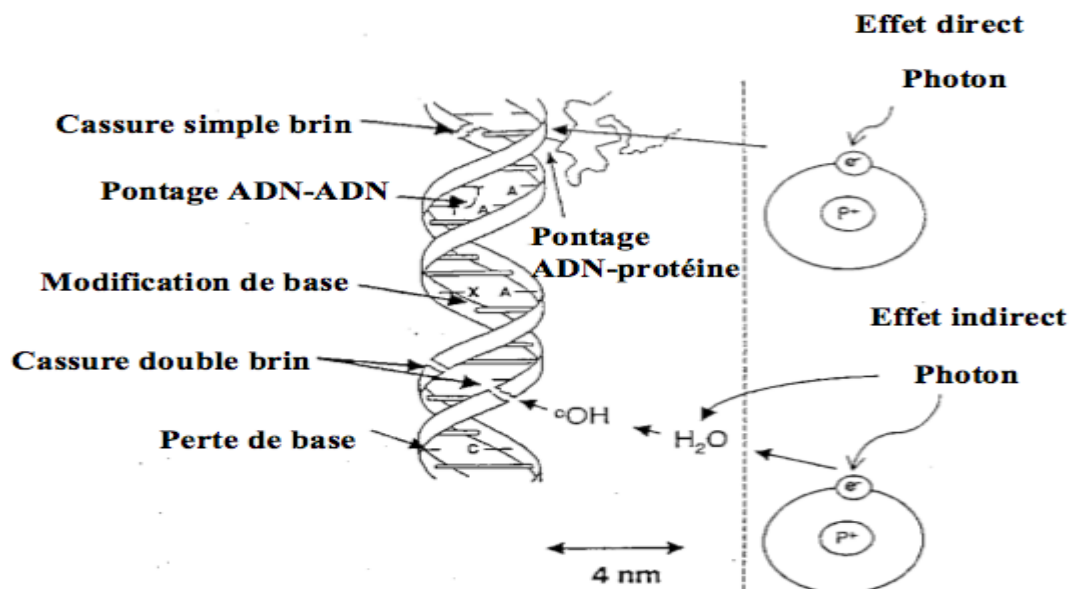


Figure 5: Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des RI

Après exposition à des RI, les principales lésions de l'ADN observées sont des cassures simple-brin, des modifications de bases, des sites abasiques, des pontage ADN-protéine, des

dimérisations entre deux bases adjacentes (par exemple des dimères de pyrimidine) photoproduits et des cassures doublebrin (Tubiana, 2008).

2.1.3 Radiosensibilité et cycle cellulaire

Des variations dans la radiosensibilité cellulaire ont été observées en fonction des phases du cycle cellulaire, les cellules de mammifères présentent ainsi une radiosensibilité augmentée en M et un maximum de radiorésistance en phase S (Tubiana, 2008). La sensibilité des cellules en mitose peut être associée à l'état chromatinien condensé qui peine à engager les mécanismes de réparation rapidement, de ce fait l'hyper-radiosensibilité en M est corrélée à un taux accru de cassures chromosomiques. La radiorésistance en phase S serait associée à la capacité optimale de réparation des cellules en phase de Synthèse liée à la nécessité de pallier les erreurs de réplication qui conduisent à la formation de CDB spontanées (endogènes) à hauteur d'environ 50 CDB par cycle (Vilenchik and Knudson, 2006). Des études ont également montré que la radiorésistance en phase S était associée à l'augmentation de la fréquence de réparation par recombinaison homologue (Tamulevicius et al., 2007; Wilson et al., 2010). Ces résultats sont en cohérence avec l'observation récente d'une augmentation de la radiorésistance de cellules issues de tumeurs gliales ayant une fréquence de recombinaison homologue élevée (Lim et al., 2012; Nicolay et al., 2012).

2.2 Le stress réplicatif

Finaliser la réplication de l'ADN avec un minimum d'erreurs est une étape critique qui permet de prévenir les dégénérescences cellulaires. Cela requiert l'intervention de centaines de protéines impliquées dans les processus de réparation et de réplication. Cependant, étant donné la taille du génome et la diversité des sources endogènes et exogènes pouvant induire un stress au cours de la phase S, phase où le génome est particulièrement vulnérable, certaines lésions peinent à être réparées ce qui entraîne des collisions avec la machinerie de réplication, induisant ainsi un stress réplicatif. Dans cette partie nous développerons de manière précise les causes majeures et les conséquences du stress réplicatif.

2.2.1 Définition du stress réplicatif

Un stress réplicatif peut être défini comme toute modification anormale des paramètres de réplication. Au cours de la progression de la réplication, l'incorporation de nucléotides et la progression des ADN polymérases peuvent être gênés par une multitude d'obstacles, ces obstacles ont été définis comme étant des RFB (Replication Fork Barriers) (Lambert and Carr, 2013a). Ils peuvent être endogènes tel qu'un ralentissement de la vitesse de réplication, une modification du profil d'activation des origines, des régions difficiles à répliquer (Fernandez-

Capetillo and Nussenzweig, 2013) ou exogènes, dûs à des agents inducteurs de dommages tels que les RI, les inhibiteurs de topoisomérases ou de ribonucléotides réductases. De manière générale, les perturbations de la réplication peuvent entraîner des arrêts de la fourche (stalling) ou des effondrements (collapse). La différence majeure entre ces deux définitions se situe au niveau du redémarrage. En effet, une fourche arrêtée peut redémarrer facilement, lorsque la drogue est éliminée par exemple. En revanche, si la fourche arrêtée n'est pas stabilisée par le biais des protéines du point de contrôle en phase S (que nous développerons plus en détail ci-dessous), elle s'effondre, le réplisome est démantelé, et le découplage du complexe hélicase /polymérase entraîne une accumulation d'ADN simple brin (ssDNA) non protégé. Ces régions sont exposées aux exonucléases qui peuvent cliver la fourche et engendrer des lésions double brin, ou encore elles peuvent s'apparier de façon inadéquate à l'ADN complémentaire et altérer l'intégrité du génome (Paulsen and Cimprich, 2007). Une fourche s'étant effondrée ne redémarrera qu'après intervention de protéines spécifiques du redémarrage des fourches notamment Mre11, PARP-1 et Rad51 (Bryant et al., 2009).

Plusieurs profils de réponse au stress réplcatif ont pu être observés en fonction du type et de la longueur du dommage induit ou encore du type de facteur intrinsèque ayant entraîné le blocage, que ce soit en termes d'activation du point de contrôle en phase S ou en termes de conséquences après effondrement de la fourche (Lambert and Carr, 2013a) ; ci-dessous nous discutons un certain nombre d'entre eux.

2.2.2 Les différentes causes de stress réplcatif

2.2.2.1 Les obstacles naturels de la fourche de réplication

La transcription représente une source majeure de stress réplcatif, car la collision entre machinerie de réplication et de transcription peut entraîner un désassemblage ou une réversion de la fourche de réplication. Ce phénomène est très complexe chez les eucaryotes où le nombre d'origines de réplication est élevé. Afin de réduire ce type de stress, la cellule régule ces deux processus de manière spatio-temporelle en les activant de façon distincte tout au long de la phase S, c'est ainsi que des analyses de microscopie ont pu montrer l'existence de clusters de transcription et de réplication complètement indépendants (Magdalou et al., 2014; Wei et al., 1998). Un autre mécanisme par lequel la transcription peut engendrer un stress réplcatif consiste en la formation d'hybrides ADN/ARN au cours de la transcription. Ces structures appelées R-loops sont génotoxiques, elles peuvent induire la formation de G-quadruplexes, bloquer la fourche, conduire à l'apparition de cassures à la fourche (Bermejo et al., 2012; Gottipati et al., 2008).

Certaines régions du génome sont plus difficiles à répliquer, elles sont communément appelées sites fragiles («commun fragile sites»). Cette fragilité peut être due à un enrichissement en bases nucléiques A et T, ces régions pouvant former des structures secondaires, (Ozeri-Galai et al., 2011) ou à un nombre d'origines de réplication réduit qui conduit à une incapacité à activer des origines latentes en cas de stress réplcatif. De plus ces sites sont souvent associés à de longs gènes au niveau desquels la collision entre la machinerie de transcription et la machinerie de réplication entraine facilement des lésions. Il a été montré que la réplication de ces régions était continuellement perturbée et extrêmement sensible au stress réplcatif (Magdalou et al., 2014).

Une activation excessive des origines de réplication peut également être associée à un stress réplcatif, il a récemment été montré que la surexpression des oncogènes Cycline E, c-myc et h-Ras augmente les événements d'initiation de réplication (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Dominguez-Sola et al., 2007). Jones et al. ont également montré qu'en plus d'une augmentation des événements d'initiation, la surexpression de la Cycline E conduit à un accroissement des conflits entre la transcription et la réplication, générant des cassures double brin au niveau des fourches bloquées (Jones et al., 2013). De plus l'augmentation des événements de réplication limite le pool de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs), ce qui est délétère pour la cellule (Magdalou et al., 2014).

2.2.2.2 Importance de l'équilibre du pool de dNTPs

Il a été largement établi qu'une carence ou un déséquilibre du pool de dNTPs influence différents aspects de la réplication, notamment le choix des origines de réplication, la vitesse de réplication, les distances inter-origines et l'usage des origines dormantes (Anglana et al., 2003; Poli et al., 2012). Toute variation de ces paramètres peut impacter sur le stress réplcatif (Magdalou et al., 2014). De plus, le pool de dNTPs est d'une importance majeure dans la maintenance de l'intégrité du génome et c'est particulièrement le cas du pool de pyrimidine dont les variations sont associées à une instabilité génétique et des transformations oncogéniques (Bester et al., 2011; Burrell et al., 2013; Chabosseau et al., 2011). Par conséquent, la synthèse des dNTPs est essentielle à la réplication et à la réparation de l'ADN, ce processus complexe dépend de deux voies majeurs que nous développons ci-dessous: la synthèse *de novo* et la voie de sauvetage (**Figure 6**).

2.2.2.2.1 Les voies de synthèse des dNTPs

Dans tous les organismes cellulaires, la ribonucléotide reductase (RNR) permet de convertir les ribonucléosides diphosphates (NDP) en déoxyribonucléotides triphosphates dNTPs

(Nordlund and Reichard, 2006), ces dNTPs sont requis pour la réplication et la réparation via la substitution du 2'-OH du ribonucléoside en di ou triphosphate par un atome d'hydrogène. La RNR peut produire quatre dNDPs : dADP dGDP dCDP et dUDP. Le pool de dNTPs est ainsi limité par l'activité de la RNR qui est hautement régulée via différents processus. La synthèse du dTTP est particulière puisque la RNR ne peut former de dTDP (**Figure 6**). Le dTTP peut être synthétisé par la thymidilate synthase (TS) à partir du dUMP, lequel provient soit de la pyrophospholyse du dUTP soit de la désamination du dCMP. La thymidilate kinase (TMPK) convertit ensuite le dTMP en dTDP (Saada, 2009). Alternativement, la thymidine peut être phosphorylée par la thymidine kinase (TK), une enzyme de la voie de sauvetage. La voie de sauvetage permet aussi de convertir les autres dNs (déoxyribonucléosides) en dNTP par l'action en séquence de la dCK (déoxycytidine kinase), de la NMPK et de la NDPK (**Figure 6**).

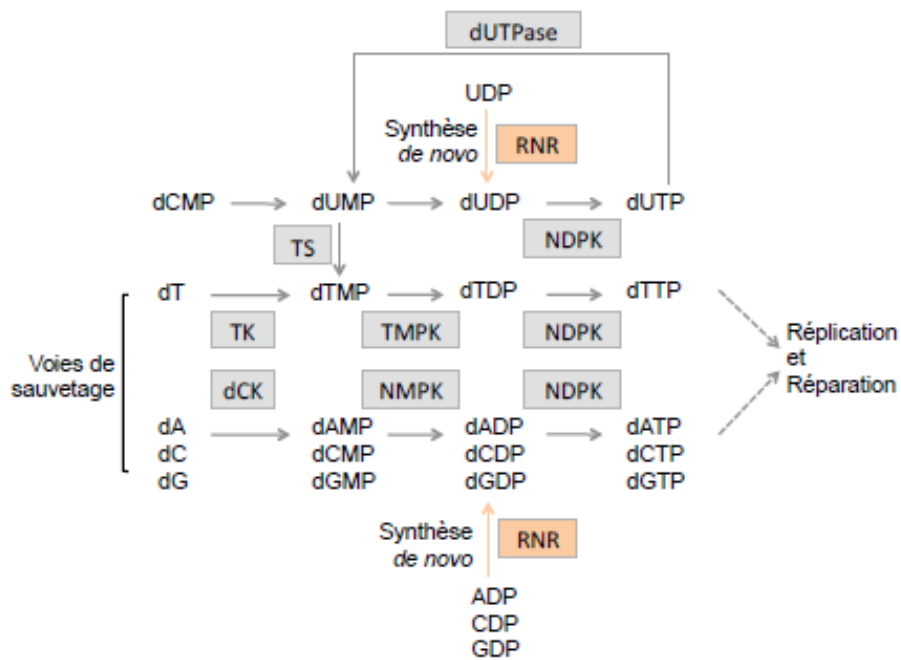


Figure 6: Les voies de synthèse des dNTPs

La voie de synthèse *de novo* utilise la RNR pour convertir les ribo-en déoxyribo-nucléotides (dNTP). Les voies de sauvetage sont les voies qui permettent aux cellules de récupérer les déoxyribonucléosides (dNs) pour les convertir en dNTPs sans intervention de la RNR. Les enzymes intervenant sont encadrées en gris. TS: thymidilate synthase, TK: thymidine kinase, dCK: deoxycytidine kinase, TMPK: thymidilate kinase, NMPK: kinase des nucléosides monophosphate, NDPK: kinase des nucléosides diphosphates. Les substrats sont les différents dérivés des purines (Adénine, A et Guanine, G) et des pyrimidines (Thymine, T, Uracile, U et Cytosine, C). L'ensemble de ces voies approvisionne la cellule en dNTPs pour la réplication et la réparation de l'ADN (d'après (Techer, 2012))

2.2.2.2.2 Régulation de la RNR

Plusieurs mécanismes permettent la régulation de l'activité de la RNR et par conséquent du pool de dNTPs produit, soit par une régulation transcriptionnelle de l'enzyme, soit par une relocalisation des sous unités ou encore par une action sur les inhibiteurs de l'activité enzymatique de la RNR.

La RNR est tout d'abord régulée au niveau transcriptionnel, en effet les gènes codant les deux sous unités R1 et R2 sont induits au cours de la phase S. La sous unité R1 possède un temps de demi-vie élevée (entre 18 et 24h), par conséquent son expression ne varie pas au cours du cycle, en revanche l'expression de la sous unité R2, qui est sous le contrôle du facteur de transcription E2F, augmente en phase S, permettant l'activité enzymatique de la RNR. En G2, l'enzyme est phosphorylée de façon Cdk dépendante et redirigée vers le protéasome.

La RNR est également régulée de façon allostérique, de ce fait son activité enzymatique augmente en présence de ses effecteurs (Aye et al., 2014; Shao et al., 2013). Enfin, il a été montré que sa localisation qui influe sur son activité enzymatique dépendrait de la proportion de dNTPs dans la cellule (Liu et al., 2005). Cependant il faut noter que certaines études ont suggéré que la synthèse de dNTPs prenait place dans le cytoplasme (Engstrom et al., 1984) alors que d'autres suggèrent que les sous unités de la RNR ne sont assemblées qu'une fois dans le noyau (Reddy and Fager, 1993), de ce fait cet aspect de la régulation est encore sujet à discussion.

2.2.3 Les drogues induisant des stress replicatif

L'hydroxurée (HU) est probablement l'un des inhibiteurs de RNR les plus utilisés en recherche. Par son action sur la sous unité R2, il permet de réduire le pool de dNTPs, provoquant un ralentissement, voire une inhibition de la synthèse d'ADN proportionnellement à la réduction des pools puriques, par un arrêt des ADN-polymérases (Collins and Oates, 1987; Hustedt et al., 2013). Les effets du HU sont réversibles dès élimination de la drogue et ils dépendent des concentrations et des temps d'exposition. Ainsi, par exemple, dans les cellules de mammifères, une exposition de 2h au HU à 2mM va induire un ralentissement de la fourche sans formation de dommages de l'ADN alors qu'un traitement plus long (plus de 12h), à la même concentration, va induire des cassures double brin et un arrêt des fourches de réplication (Petermann et al., 2010; Saintigny et al., 2001). Cet inhibiteur s'est avéré efficace en clinique, dans le traitement de la drépanocytose (Agrawal et al., 2014) et en oncologie.

L'aphidicoline (APH) agit par l'inhibition des ADN polymérases, sans affecter les hélicases, par conséquent l'ADN polymérase est bloquée alors que les hélicases MCM continuent à générer de l'ADN simple brin (ssDNA). Ce découplage du complexe hélicase/polymérase génère un stress réplcatif qui active le point de contrôle en phase S (Hustedt et al., 2013).

La Camptothécine cible la topoisomérase I dont rôle principal est de relâcher la torsion rotationnelle de l'ADN pendant les processus de transcription et de réplication. Elle forme un complexe avec l'ADN grâce à une liaison covalente avec une extrémité 3'. Ce complexe, stabilisé par la présence de la Camptothécine, entrerait en collision avec une fourche de réplication, ce qui produirait des coupures double brin de l'ADN, à l'origine de la cytotoxicité de la Camptothécine. Cette drogue n'active que partiellement le point de contrôle de la phase S, car ce traitement n'entraîne pas de découplage hélicase/polymérase. La réparation des CDBs induites requiert des mécanismes de recombinaison préalablement au redémarrage de la fourche (Hustedt et al., 2013).

3. Les points de contrôles du cycle cellulaire en réponse aux stress génotoxiques

Il existe trois principaux points de contrôle distincts au cours de la progression dans le cycle cellulaire : l'arrêt à la transition G1/S, le point de contrôle intra-S, et l'arrêt à la transition G2/M. Ces points de contrôle ont tous pour point commun l'activation des médiateurs ATM et ATR (**Figure 7**). L'arrêt à la transition G1/S permet de prévenir l'entrée en phase S de cellules endommagées par son action inhibitrice sur les complexes Cycline D-Cdk4/6 et Cycline E-Cdk2. Ces complexes ne pourront pas phosphoryler la protéine Rb. Pour cela, deux axes de signalisation sont activés : l'axe p53-p21 dépendant et l'axe p53 indépendant faisant intervenir les cascades ATM-Chk2 et ATR-Chk1 (voir la revue Fernet *et al.* (Fernet, 2013) pour les détails).

Le point de contrôle intra-S est activé en réponse au stress induit au cours de la réplication et va permettre de ralentir la réplication et d'inhiber le passage en mitose, le temps de réparer les lésions induites en phase S. Enfin, le point de contrôle G2/M bloque le passage en mitose par son action sur le complexe mitotique (Cycline B-Cdk1). La fonction de ces deux points de contrôle sera détaillée dans les paragraphes suivants.

3.1 La signalisation des dommages et l'activation des points de contrôles

L'accumulation d'ADN non réparé est l'un des risques les plus sérieux pour la stabilité génomique, les points de contrôle du cycle cellulaire permettent la mise en place d'une fenêtre de temps durant laquelle la cellule peut réparer ses lésions. Ces mécanismes sont bien

conservés au cours de l'évolution et initiés par des cascades de signalisation qui permettent d'arrêter ou de ralentir la progression dans le cycle cellulaire le temps de réparer les dommages.

La réponse aux dommages se fait via ATM, ATR et DNA-PK qui sont les trois kinases clés régulatrices de cette réponse. Elles font partie de la famille des PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) et sont activées par différents types de dommages : ATM et DNA-PK sont activées par la présence des cassures double brin, alors qu'ATR est activée par une multitude de dommages induisant une accumulation d'ADN simple brin. Différents senseurs permettent leur activation, c'est ainsi qu'ATM est recruté et activé grâce au complexe Mre-11-Rad50-Nbs1 (MRN) (Lee and Paull, 2005; Uziel et al., 2003), DNA-PK grâce à l'hétérodimère Ku80-Ku70 (Smith and Jackson, 1999), et ATR reconnaît l'ADN simple brin lié à RPA via ATRIP (Paulsen and Cimprich, 2007; Zou and Elledge, 2003).

ATM et ATR sont au cœur de l'activation des points de contrôle, elles possèdent plusieurs cibles communes et phosphorylent préférentiellement les résidus serines ou thréonine suivis par la glutamine ((S/T) Q) (Kim et al., 1999). Leur activation va permettre la phosphorylation des protéines médiatrices du signal tel que Nbs1, 53BP1, MDC1, TopBP1, BRCA1 et la Claspine, qui, à leur tour, régulent et activent les kinases effectrices Chk1 (Checkpoint kinase 1) et Chk2 (Checkpoint kinase 2) qui agiront sur la progression dans le cycle cellulaire (Iliakis et al., 2003; Stracker et al., 2009) (**Figure 7**).

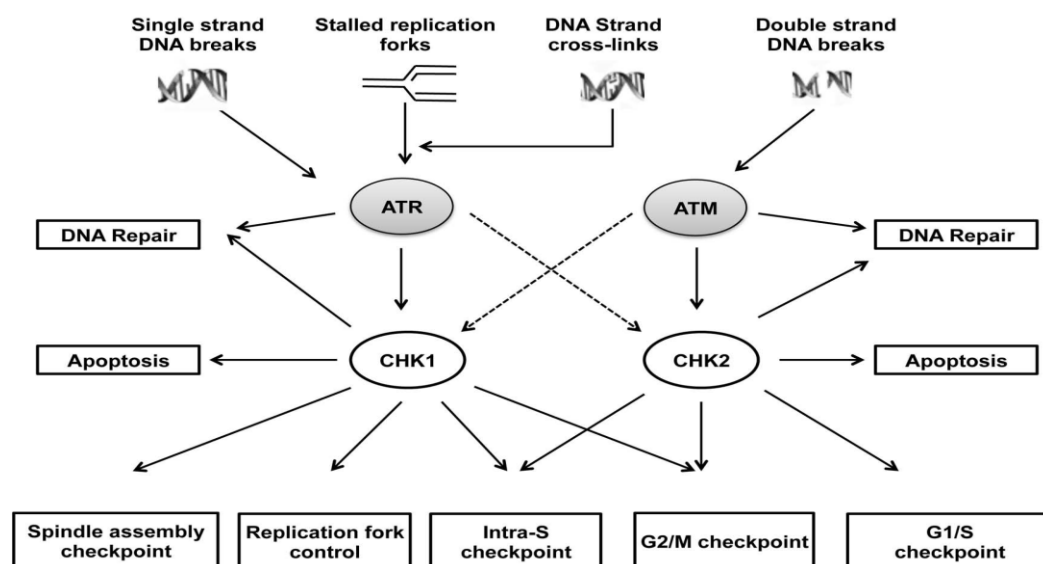


Figure 7: Les différents points de contrôle chez les mammifères

Les différents stress endogènes et exogènes de la cellule sont reconnus par les deux kinases ATM et ATR qui activent Chk1 et Chk2, ces voies de signalisation vont permettre la mise en place des différents points de contrôle G1/S, intra-S et G2/M. De plus, ces kinases initient les

mécanismes de réparation et dans le cas d'une activation prolongée du point de contrôle, elles peuvent également initier l'apoptose par des mécanismes p53 dépendants (d'après (Fernet, 2013)).

3.2 Le point de contrôle intra-S

Le point de contrôle intra-S est un système de surveillance qui permet de détecter les lésions (simple ou double brin) induites au cours de la phase S et de contrôler la progression à l'aide de différentes actions (**Figure 8**): 1) inhiber l'initiation de nouveaux événements de réplication, 2) protéger les fourches arrêtées et les stabiliser pour éviter un effondrement et 3) inhiber le passage en mitose de sorte que les lésions accumulées soit réparées et l'ADN totalement répliqué. Pour cela le point de contrôle en phase S met en place deux cascades de signalisation dépendantes des deux voies ATR-Chk1 et ATM-Chk2.

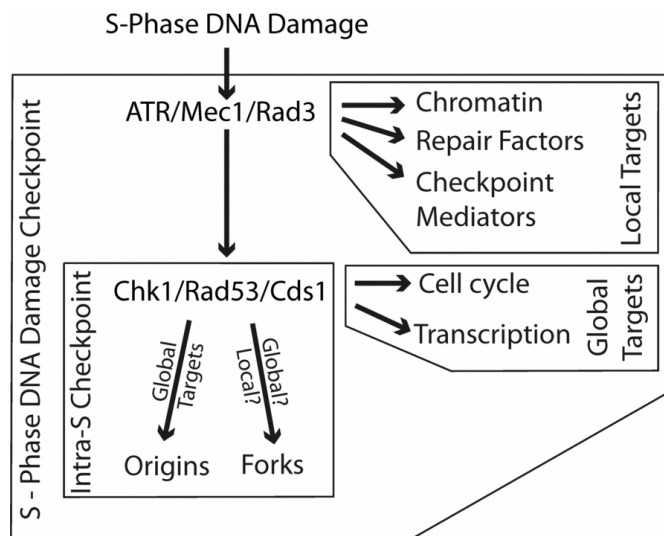


Figure 8: Diagramme schématisant le point de contrôle en phase S

L'activation d'ATR par les dommages en phase S a un effet local sur la chromatine, la phosphorylation des protéines de réparation et l'activation des médiateurs du point de contrôle intra-S, principalement Chk1. L'activation de Chk1 de manière globale cible les protéines du cycle cellulaire et en régule la dynamique de réplication par la répression des origines latentes (d'après (Iyer and Rhind, 2013)).

3.2.1 La voie ATR dépendante

3.2.1.1 La reconnaissance de l'ADN simple brin: rôle de la protéine RPA

Différents types de lésions et structures de l'ADN peuvent bloquer la fourche de réplication. Afin de stabiliser cette dernière, la kinase ATR doit reconnaître le signal et activer la cascade en aval (**Figure 9**). Une de ces structures est l'ADN simple brin, il peut être formé suite au découplage hélicase/polymérase ou être la conséquence d'une déficience du mécanisme de réparation des cassures simple brin, ou encore apparaître suite à de la résection au niveau des

CDBs. Il contribue à l'activation du point de contrôle dans la mesure où la protéine RPA reconnaît et interagit avec le ssDNA et ATR est activé grâce à son interaction avec la protéine RPA, par l'intermédiaire du complexe ATR-ATRIP. De ce fait, RPA joue un rôle majeur dans l'activation du point de contrôle intra-S, nous détaillerons les diverses fonctions de cette protéine dans le paragraphe 5.

Le complexe ssDNA-RPA est reconnu par la protéine ATRIP qui se lie à RPA via son extrémité N-Terminale et à ATR via son extrémité C-Terminale. Il a ainsi été montré que RPA et ATRIP étaient requis pour la localisation d'ATR au niveau du dommage. Cependant la nécessité de la protéine RPA pour l'activation d'ATR est assez controversée, certaines études *in vitro* ont clairement montré que le complexe ATR/ATRIP peut interagir avec des structures ssDNA en absence de RPA. La perturbation de l'interaction RPA-ATRIP réduit fortement mais pas complètement le recrutement d'ATR au niveau de la fourche bloquée et la mutation de RPA n'impacte pas sur la phosphorylation de Chk1, « cible directe d'ATR », même si plusieurs études montrent que le recrutement de RPA promeut l'activation d'ATR et de Chk1. RPA est ainsi suffisant pour recruter ATR au site de dommage mais non pour l'activer. En effet, en plus du complexe RPA-ATRIP-ATR, deux autres complexes : Rad17-RFC 2.5 et Rad9-Rad1-Hus1 (communément appelé (9-1-1)) sont requis pour l'activité kinase d'ATR ; ils sont également senseurs de RPA lié au ssDNA. Ces protéines forment des anneaux autour de l'ADN pouvant se lier directement à RPA. L'activité complète du point de contrôle se fait lorsque le complexe 9-1-1 recrute TopBP1 (Kumagai et al. 2006), ce qui permet de stimuler et de stabiliser ATR au niveau de la fourche (Choi et al., 2010).

3.2.1.2 Les protéines cibles d'ATR

Des tests *in vitro* ont mis en évidence le large panel des substrats d'ATR (Matsuoka et al., 2007) mais le plus important reste Chk1. ATR active Chk1 par la phosphorylation des sérines 317 et 345, entraînant la mise en place du point de contrôle. L'activation de Chk1 par ATR nécessite également la présence de la protéine Claspin qui permet le recrutement de Chk1 à la fourche. La Claspin est également un substrat d'ATR dont la phosphorylation est nécessaire pour l'interaction Chk1-Claspin. En réponse aux CDB, la Claspin et BRCA1 sont nécessaires pour la phosphorylation de Chk1. D'autres protéines telles que Timless et Tipin sont également nécessaires à l'activation de Chk1. Timless se lie à ATR et Chk1 et Tipin à la Claspin. ATR phosphoryle également RPA, Rad9, Rad17 et TopBP1, ce qui permet la maintenance d'une boucle d'activation. Par exemple la protéine RPA qui a servi au recrutement d'ATR sera directement phosphorylée par ATR sur la sérine 33, activant une

cascade de signalisation impliquée dans la réparation. ATR phosphoryle également une multitude d'autres substrats impliqués dans la stabilisation de la fourche de réplication et dans la réparation tel que ATRIP, RAD17, RAD9, TopBP1, H2AX, WRN, BLM, BRCA1 et FANCD2.

3.2.1.3 Conséquences de l'activation de Chk1 :

La voie ATR-Chk1 activée a un impact direct sur les fonctions suivantes (**voir Figure 9**) :

- La stabilisation de la fourche de réplication
- L'inhibition des origines de réplication
- L'inhibition de la progression en mitose
- La réparation (voir paragraphe 4)
- Le point de contrôle G2/M (voir paragraphe 3.3)

3.2.1.3.1 La stabilisation de la fourche de réplication

La stabilisation d'une fourche de réplication consiste à maintenir les composants du réplisome associés à la fourche. L'activation du point de contrôle ATR-Chk1 permet d'éviter toute dissociation et de prévenir le recrutement précoce des protéines de recombinaison au site de blocage (Lucca et al., 2004). En effet, en l'absence d'un point de contrôle efficace, il y a réversion de la fourche, ce qui entraîne des événements exonucléolitiques et une formation de CDB. Chez les mammifères, le recrutement de SMARCA1, protéine impliquée dans le « single strand-annealing », par RPA, et sa phosphorylation ATR dépendante sur la sérine 652 permettent de prévenir une progression aberrante de la fourche et son effondrement (collapse) (Couch et al., 2013; Couch and Cortez, 2014). Le rôle de Chk1 dans la stabilisation de la fourche n'est pas précisément défini, en effet, les travaux surprenants de De Piccoli et al, (De Piccoli et al., 2012) chez différents mutants de la levure *S.cerevisiae*, ont montré par des expériences d'immunoprécipitation que les souches mutés pour Mec-1 (homologue d'ATR chez l'homme), et Rad53 (homologue de Chk2 chez l'homme) conservent un réplisome complètement intacte après induction de stress à l'hydroxyurée. Cependant il est établi que l'inhibition de Chk1 conduit à un clivage des fourches bloquées par Mus81/Eme1, générant des cassures double brin, suggérant que l'endonucléase Mus81/Eme1 serait requise pour la stabilisation de la fourche de façon Chk1 dépendante (Formont et al., 2011; Pepe and West, 2014).

3.2.1.3.2 La répression des origines tardives

En plus du contrôle de la stabilité de la fourche, l'activation de Chk1 permet de réguler le contrôle de l'initiation des origines tardives (Katsuno et al., 2009; Liu et al., 2006). En effet, l'inhibition de Chk1 augmente l'initiation de ces origines après induction de stress réplcatif (Ge and Blow, 2010; Scorah and McGowan, 2009). Certaines données suggèrent que le contrôle de l'initiation des origines tardives passe par l'inhibition du complexe Cycline E/Cdk2. Une déficience de ce contrôle conduit à une duplication incomplète du génome et un passage G2/M précoce, entraînant des catastrophes mitotiques (Scorah and McGowan, 2009).

3.2.1.3.3 L'inhibition de la progression en phase S

En réponse à un stress génotoxique en phase S, Chk1 phosphoryle également la phosphatase Cdc25A. La phosphorylation de Cdc25A l'inactive, ne permettant pas la déphosphorylation et donc l'activation des complexes Cycline E/Cdk2 et Cycline A/Cdk2, entraînant le ralentissement de la phase S par l'inhibition du recrutement de Cdc45 au niveau des origines de réplication (Zhang and Hunter, 2014).

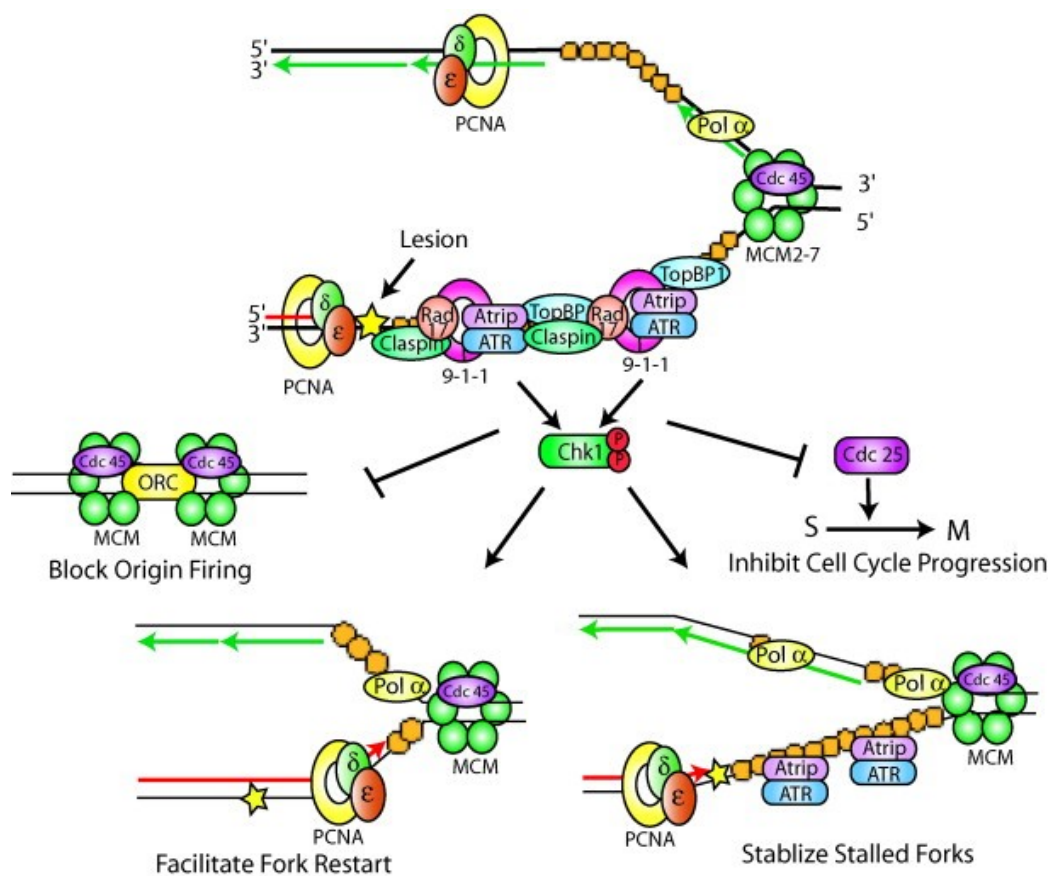


Figure 9: Activation du point de contrôle de réplication

Le découplage du complexe hélicase/polymérase entraîne une accumulation d'ADN simple brin qui initie la cascade ATR dépendante et active Chk1. L'activation de Chk1 favorise la stabilité génomique par son rôle dans l'inhibition des origines tardives, l'inhibition de la progression en mitose, la stabilisation de la fourche bloquée et son redémarrage (d'après (Paulsen and Cimprich, 2007)).

3.2.2 La voie ATM dépendante

ATM coopère avec ATR pour induire le point de contrôle intra-S mais leur rôle exact diffère en fonction de la nature du dommage et du type de stress réplcatif. Le rôle d'ATM en réponse aux RI est bien connu mais celui en réponse aux CDBs induites au niveau des effondrements de fourche l'est moins. Comme nous l'avions évoqué précédemment, l'interaction du complexe senseur «MRN» et de la kinase ATM initie une cascade de signalisation aux sites des cassures double brin (**Figure 10**). ATM est activée suite à sa monomérisation et sa phosphorylation sur la sérine 1981, ce qui permet son recrutement aux sites de dommages (Boohaker and Xu, 2014). ATM phosphoryle un grand nombre de protéines cibles parmi lesquelles le complexe MRN et H2AX. La phosphorylation de H2AX permet le recrutement de la protéine MDC1 (Stucki et al. 2005) qui contribue à l'amplification du signal via le recrutement de la protéine RNF8. Cette E3 ubiquitine ligase permet l'ubiquitinylation de l'histone H2A et H2AX afin de promouvoir le recrutement de 53BP1 et d'autres protéines de réparation, notamment BRCA1, RNF168 et CtIP (Fernet, 2013; Reinhardt and Yaffe, 2013). Ce mécanisme d'amplification MDC1 dépendant est nécessaire au point de contrôle puisqu'il a été montré que l'induction de dommages dans un contexte MDC1 sous exprimé réduisait significativement la formation de foyers MRN et entraînait une entrée prématurée en phase G2 (Goldberg et al., 2003; Stewart et al., 2003).

ATM phosphoryle également un médiateur particulier, Chk2, sur la Tyr68 permettant son activation par son autophosphorylation sur deux autres sites, Thr383 et Thr387. Il en résulte la phosphorylation inhibitrice de la phosphatase Cdc25A qui inhibe le complexe Cycline E-Cdk2 et de ce fait le recrutement de Cdc45 aux origines de réplication, qui est requis en début de phase S. La protéine Dbf4 qui fait partie du complexe Cdc7/Dbf4, également essentiel pour l'initiation de la réplication a été montré comme étant un substrat potentiel d'ATM dans des études protéomiques (Matsuoka et al., 2007) et sa phosphorylation par ATM et ATR semble essentielle pour l'activation du point de contrôle et pour éviter la re-réplication (Lee et al., 2012). ATM phosphoryle également plusieurs autres substrats jouant un rôle dans le point de contrôle en phase S, notamment Nbs1, SMC1 et FANCD2 qui constituerait une voie de signalisation indépendante de la voie ATM-Chk2-Cdc25A. Il a été montré que la

phosphorylation de la protéine SMC1 sur les serines 966 et 957 par ATM était requise pour l'activation du point de contrôle intra-S en réponse aux irradiations. Cette phosphorylation serait dépendante de la protéine Nbs1. De plus, les travaux de Taniguchi *et al.* montrent que la phosphorylation de FANCD2 sur la serine 122 par ATR est aussi requise pour le point de contrôle intra-S après irradiation, et que cette phosphorylation est dépendante des protéines NBS1 et Mre11. Cependant, le lien entre les différentes protéines de cette nouvelle voie ainsi que les effecteurs permettant l'arrêt en phase S sont encore à définir (Boohaker and Xu, 2014; Falck et al., 2002).

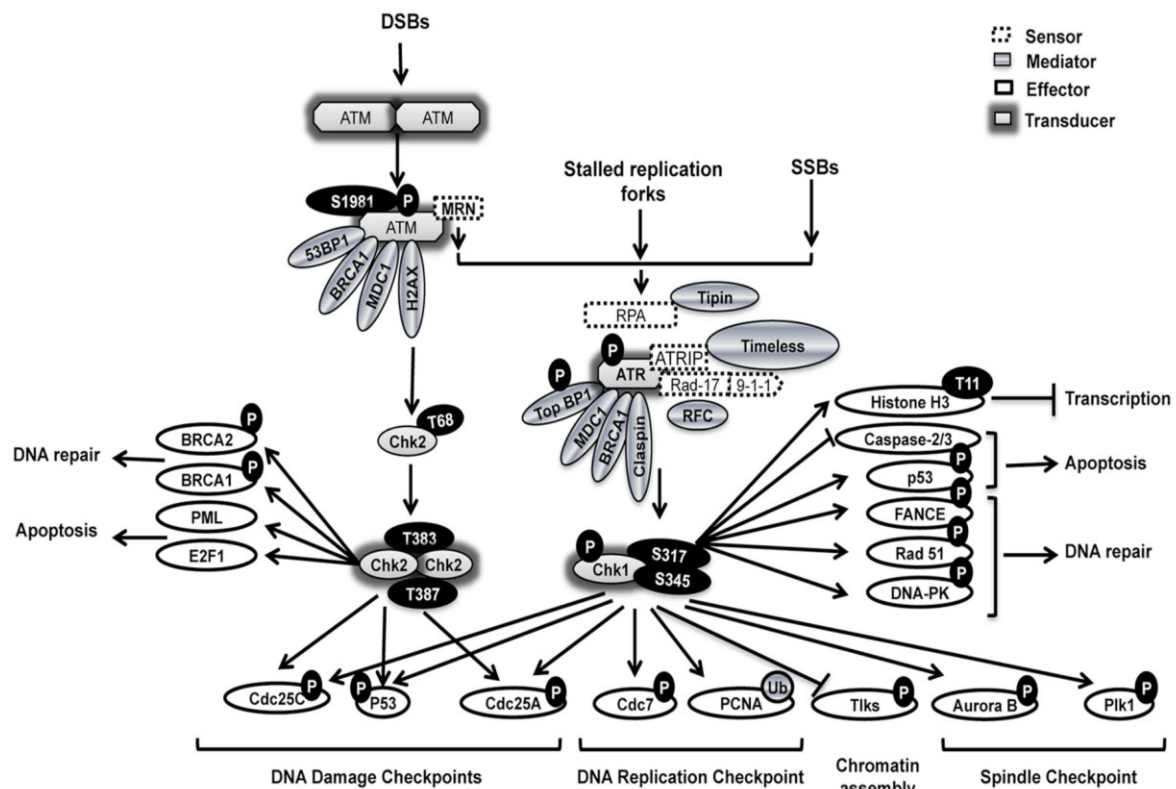


Figure 10: Implication des voies ATM et ATR dans la signalisation du dommage

Les blocages de fourches et les cassures de l'ADN activent les cascades ATM-Chk2, ATR-Chk1, qui initient les mécanismes de réparation, les points de contrôle du cycle cellulaire, et l'apoptose afin de maintenir l'intégrité du génome (d'après (Fernet, 2013)).

3.3 Le point de contrôle G2/M

Le point de contrôle du passage de la phase G2 vers la mitose est décisif puisqu'il va faire en sorte que la mitose ne soit pas déclenchée tant que la réplication n'est pas totalement et correctement achevée. Il est régulé par le complexe Cycline B/Cdk1, par conséquent Cdk1

sera l'ultime cible dont la phosphorylation inhibitrice devra être maintenue afin de bloquer l'entrée en mitose. Cette phosphorylation dépend des kinases Wee1 et Myt1 et des protéines de la famille des phosphatases Cdc25 (A/B/C) (**Figure 11**). Les kinases Wee1 et Myt1 phosphorylent Cdk1 sur la tyrosine 15 inhibant son activité et les phosphatases Cdc25 lèvent cette inhibition lors du passage en mitose.

En fonction du stress génotoxique induit, les voies ATM/Chk2 et ATR/Chk1 seront activées en amont : Chk1 et Chk2 activés phosphorylant Cdc25 A, B et C, ce qui entraîne sa séquestration dans le cytoplasme et sa dégradation. Cdc25B est également la cible d'une autre voie indépendante qui est la voie p38/MK2 (Thornton and Rincon, 2009).

Au cours de la progression normale en G2, la protéine PLK1 active le complexe Cycline B/Cdk1 via l'inhibition des protéines inhibitrices Myt1 et Wee1 (Zitouni et al., 2014), en réponse aux irradiations la protéine PLK1, cible d'ATM, est dégradée par le complexe APC/C, ce qui stabilise Wee1 et de ce fait inhibe le complexe Cycline B/Cdk1 (Bassermann et al., 2008). Des évidences ont également montré que la protéine BRCA1 communément connue pour son rôle dans la recombinaison homologe, interviendrait également dans le point de contrôle G2/M. En effet, la phosphorylation de BRCA1 par ATM sur la serine 1423 activerait Chk1 (Xu et al., 2001). De plus, BRCA1 régule l'expression de Wee1 (Yarden et al., 2002).

La cellule dispose d'un second mécanisme capable de prolonger le point de contrôle en G2, il s'agit du point de contrôle p53 dépendant. Les kinases ATM, ATR mais aussi Chk1 et Chk2 phosphorylent p53 qui, activé, va augmenter la transcription des inhibiteurs de Cdks, notamment p21 et Gadd45. p21 inhibe Cdk1 directement par la phosphorylation du site Thr161 et Gadd45 permet la dissociation du complexe Cycline B/Cdk1. p53 peut également réprimer directement l'expression de la Cycline B, Cdc25B et PLK1 (Medema and Macurek, 2012; Taylor and Stark, 2001).

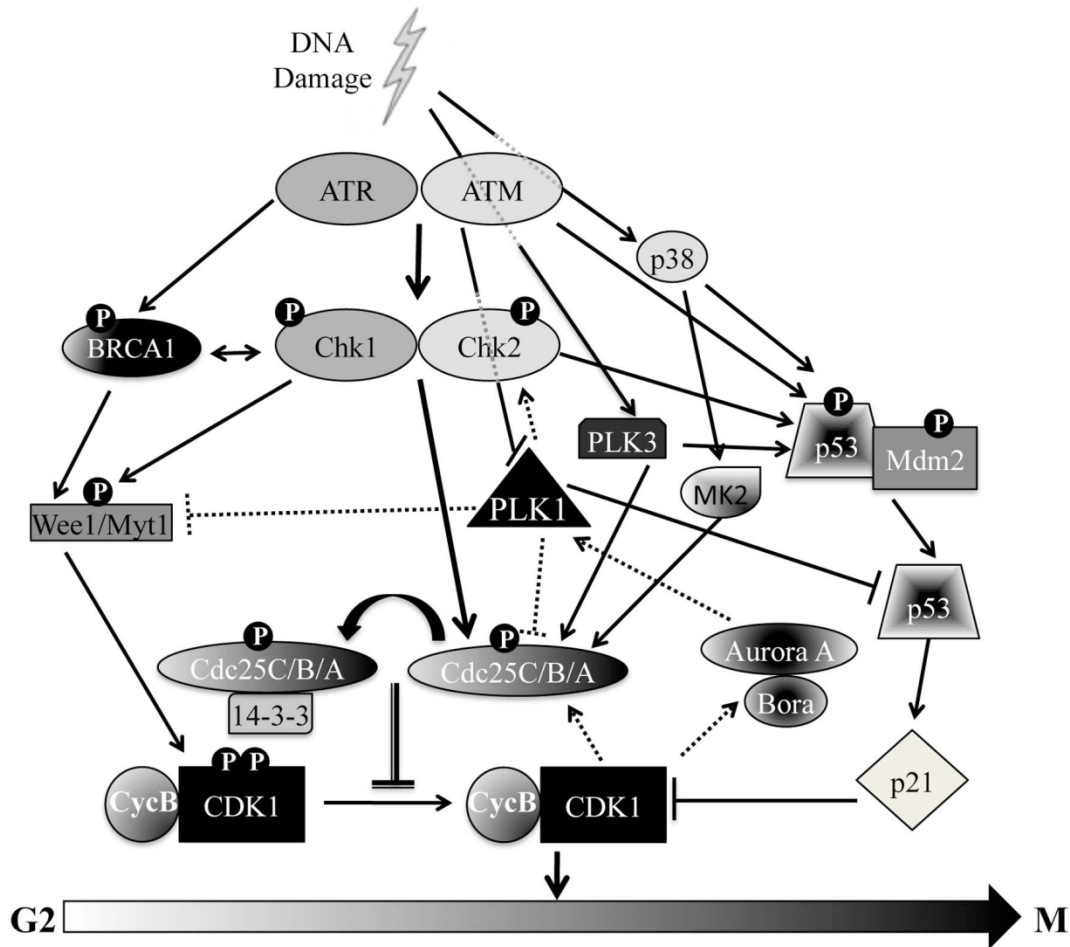


Figure 11 : Organisation moléculaire du point de contrôle G2/M

En réponse aux dommages, le point de contrôle G2/M est activé par la voie p53 indépendante *via* Chk1 et Chk2 et par la voie p53 dépendante, dans les deux cas le complexe cycline B/Cdk1 est maintenu en état phosphorylé afin de bloquer le passage en mitose (voir texte pour plus de détails) (d'après (Fernet, 2013))

4. Introduction aux mécanismes de réparation des CDBs

Des dommages de l'ADN se produisent en permanence dans la cellule, de façon endogène ou exogène. Afin de gérer ces lésions et de préserver l'intégrité du génome, la cellule a développé une multitude de mécanismes de réparation. Parmi ces lésions, les plus délétères sont les CDB. Non réparées, elles induisent des translocations et des délétions chromosomiques qui favorisent l'instabilité génomique et la survenue de cancers. Pour la suite de cette partie nous nous focaliserons sur ce type de dommage.

Il existe deux mécanismes majeurs de réparation des CDBs: la réparation par Recombinaison Homologue (HR) et la réparation par Jonction d'extrémités Non Homologue (NHEJ ou C-NHEJ pour Non Homologous End Joining). Le HR requiert la présence d'une chromatide

sœur comme matrice, par conséquent ce mécanisme est fidèle et conservatif. Le NHEJ consiste en un raboutage direct des extrémités de l'ADN, il est donc dit « infidèle » et est source d'instabilité génomique. D'autres voies minoritaires ont également été décrites tel que le Single Strand Annealing (SSA) et la voie alternative au NHEJ (alt-NHEJ/alt-EJ/MMEJ) qui ne nécessitent pas d'homologie de séquence mais qui sont initiées par la résection (Grabarz et al., 2012).

4.1 Les modifications chromatinienne autour du dommage

La présence d'une CDB crée tout d'abord une décondensation de la chromatine, ATP dépendante, qui survient avant même le recrutement d'ATM (Kim et al., 2009; Shi and Oberdoerffer, 2012). Ces modifications sont reconnues comme primordiales et déterminantes pour l'initiation de la cascade de signalisation, et de nombreux travaux suggèrent que les modifications chromatinienne permettent l'accès et la reconnaissance du dommage. Il a été montré, par exemple, que l'activation d'ATM dépendait de la protéine HMGN1 qui, par son activité de régulation des modifications des histones, permet l'interaction d'ATM avec la chromatine (Kim et al., 2009). D'autres facteurs de remodelage tels que INO80 et ISWI en présence de leurs substrat H2AZ et γ H2AX facilitent l'accès aux premiers facteurs de reconnaissance tel que le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) (Morrison and Shen, 2009). Après irradiation, l'une des premières modifications que l'on note est la ribosylation catalysée par les poly(ADP-ribose) polymérases (PARPs) et en particulier PARP-1. Cette enzyme permet l'addition de branches de poly(ADP-ribose) (PARs) sur elle-même, induisant son recrutement très rapide au dommage, mais aussi sur les protéines adjacentes, notamment l'Histone H2A et ATM. La présence de la PARP-1 et des PARs permettront également le recrutement d'autres facteurs de remodelage de la chromatine tel qu'ALC1 (Ahel et al., 2009; Gottschalk et al., 2009), le complexe Kap-1/HP1, qui permet la décondensation de la chromatine, et le groupe des polycomb (NurD, PcG) qui permettent l'ubiquitination des histones. La reconnaissance du dommage se fait à la suite par le complexe MRN qui recrute la kinase ATM et permet son autophosphorylation, ce qui initie le recrutement d'autres protéines au site de dommage et entraîne la suite des modifications chromatinienne qui détermineront le mode de réparation (Goodarzi and Jeggo, 2012).

4.2 La reconnaissance et la signalisation du dommage

La reconnaissance des CDBs de l'ADN fait appel à des protéines senseurs, il s'agit du complexe MRN qui initie le HR, le SSA et le Alt-NHEJ et du complexe Ku (Ku80/Ku70) qui permet la mise en place du NHEJ. Le recrutement de ces protéines au niveau du dommage

conduit à l'activation des cascades de signalisation, l'accès aux protéines de réparation et finalement la réparation du dommage (**Figure 12**).

4.2.1 Le complexe MRN

Le complexe MRN est constitué des trois protéines Mre11, Nbs1 et Rad50. La protéine Mre11 est au centre du complexe, formant un homodimère capable de se lier aux protéines Rad50 et Nbs1 mais aussi à l'ADN. Une fois lié à l'ADN, il exerce une activité endonucléasique et exonucléasique 3'-5' (Trujillo et al., 1998). Rad50 possède un domaine ATP qui permet le positionnement des extrémités d'ADN au niveau du site actif de Mre11 (Chiruvella et al., 2013). L'interaction Mre11/Rad50 promeut l'activité endo- et exonucléasique de Mre11 et la protéine Nbs1 est responsable de la localisation nucléaire du complexe et agit comme adaptateur à l'aide de sa partie N-terminale. En effet, Nbs1 possède un motif FHA adjacent à deux motifs BRCT qui permettent l'interaction et la phosphorylation de plusieurs protéines (Thompson, 2012). Nbs1 procure ainsi au complexe MRN son rôle signalétique et permet entre autres l'activation des kinases ATM et ATR. Plus de 50 modifications post traductionnelles ont été observées sur le complexe MRN, leur rôle n'est pas pour toutes clairement défini mais elles contribuent à la régulation du complexe (Williams et al., 2010).

Le complexe MRN est requis pour la détection, la signalisation, la protection et la réparation des cassures double brin. Au niveau de la réparation, par exemple, son activité endonucléasique est essentielle pour l'initiation de la recombinaison homologe, alors que son activité exonucléasique est requise pour le Alt-NHEJ. Récemment il a été proposé que ces diverses fonctions dépendent de la conformation adoptée par le complexe Mre11/Rad50 (MR) qui est liée à son activité ATPasique. En effet, il a été montré que la conformation fermée correspondant au complexe MR lié à l'ATP permet la reconnaissance et l'interaction avec les extrémités de l'ADN, l'activation d'ATM et conduit à la ligation des extrémités d'ADN, alors que l'hydrolyse de la molécule d'ATP, qui entraîne l'ouverture de la structure MR, elle, promeut l'activité endonucléasique, la résection et par conséquent la recombinaison homologe. Ces résultats suggèrent que la conformation du complexe MR impacte sur le choix du type de réparation. Ces résultats ont été observés dans des mutants *S. cerevisiae* et *S. pombe* et restent à confirmer chez les mammifères, mais ils suggèrent fortement l'implication du complexe MRN dans le choix du type de réparation (Deshpande et al., 2014; Williams et al., 2010).

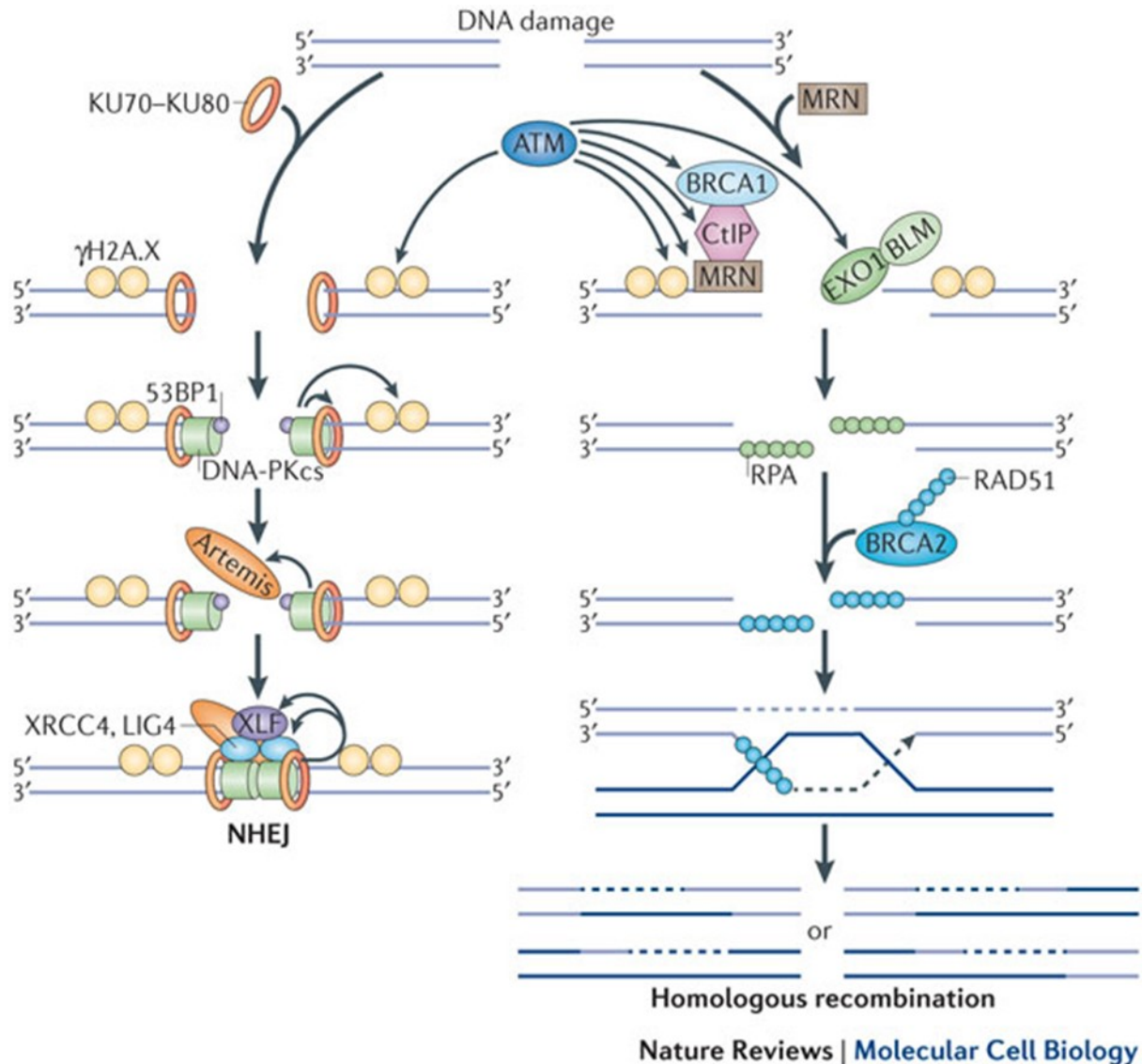


Figure 12: Représentation schématique des mécanismes de réparation des CDBs

Les CDBs sont reconnues soit par le MRN soit par le complexe Ku, ce qui active la signalisation des dommages et leur réparation par Recombinaison Homologue ou NHEJ (d'après (Chowdhury et al., 2013)).

4.2.2 La cascade de signalisation : les effecteurs

Le complexe MRN va permettre le recrutement de plusieurs protéines essentielles pour la réparation dont ATM qui est l'une des premières kinases activées. Le MRN recrute également le complexe acétyl transférase (TIP60/Nu4) qui interagit avec les histones et dont le recrutement et la phosphorylation sont nécessaires à l'acétylation d'ATM qui permet son autophosphorylation et son activation. ATM activé phosphoryle une multitude de substrats parmi lesquels H2AX qui permettra l'amplification du signal et l'accumulation d'autres protéines de réparation et MDC1 (Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1) qui se localise au niveau du dommage en interagissant avec γH2AX et Nbs1, permettant la

phosphorylation d'autres molécules de H2AX par ATM. MDC1 est également phosphorylée par ATM et permettra le recrutement des ubiquitines ligases RNF8 (Ring finger protein 8) et RNF168 qui modifient H2AX et engendrent d'autres ubiquitinations et sumoylation qui permettent le recrutement de 53BP1 et BRCA1, deux protéines critiques pour le choix du type de réparation (HR/NHEJ) (Liu et al., 2014). Un nouveau médiateur du complexe MRN vient d'être identifié : la protéine Rad17. En effet, cette protéine qui était jusque-là connue pour son rôle dans l'activation de la voie ATR-Chk1, s'avère également nécessaire pour l'amplification du signal ATM-MRN en réponse aux CDB (Cassures Double Brin). Wang *et al.* ont montré que Rad17 interagit directement avec Nbs1 et est phosphorylée par ATM sur sa Thr 622, et que son absence réduit fortement les foyers γ H2AX (qui représentent l'histone H2A phosphorylé sur la serine 139), le recrutement de la protéine MDC1 et par conséquent impacte sur la résection par une réduction du recrutement de P-RPAS4S8 et Rad51 après irradiation laser (Wang et al., 2014).

4.3 Choix du mécanisme de réparation : La balance HR/NHEJ- BRCA1/53BP1

Comme nous venons de l'évoquer la plateforme MDC1, RNF8 et RNF168 permet le recrutement de BRCA1 et 53BP1, ces deux facteurs sont en compétition au niveau de la cassure. Le modèle proposé par l'équipe de Nussenzweig en 2010 (Bothmer et al., 2010) explique comment le recrutement de 53BP1 à la lésion inhibe la signalisation ATM dépendante qui est nécessaire pour la phosphorylation de la protéine CtIP et l'initiation de la résection, première étape de la réparation par HR. En effet, il a été montré que la perte de 53BP1 augmentait la fréquence de la réparation par recombinaison homologue dans des mutants BRCA1, et que BRCA1 en phase S initie la résection en empêchant le recrutement de 53BP1 au site de réparation (Bothmer et al., 2010; Bunting et al., 2010).

Ce choix est dépendant de la phase du cycle cellulaire, en effet la recombinaison homologue est absente au début de la phase G1, elle augmente progressivement en phase S pour atteindre un pic au milieu de la phase S, puis décline progressivement en fin de phase S et G2 (Karanam et al., 2012) ce qui est cohérent avec l'augmentation de la résection qui est Cdk dépendante. Le modèle (**Figure 13**) explique comment, en phase G1, 53BP1 est phosphorylée par ATM et se localise au niveau du dommage, bloquant la résection. A la transition S/G2 CtIP est phosphorylée par les complexes cyclines/Cdk formant un complexe avec BRCA1 et le MRN déplace 53BP1, initiant la résection.

Même si la réparation par recombinaison homologue est privilégiée tout au long de la phase S, il existe d'autres mécanismes de réparation des cassures double brins tels que le Alt-NHEJ

et le NHEJ qui peuvent être activés en cas de blocage de fourche (Couedel et al., 2004; Guirouilh-Barbat et al., 2008; Lundin et al., 2002; Saintigny et al., 2001), nous les détaillerons dans les paragraphes ci-dessous.

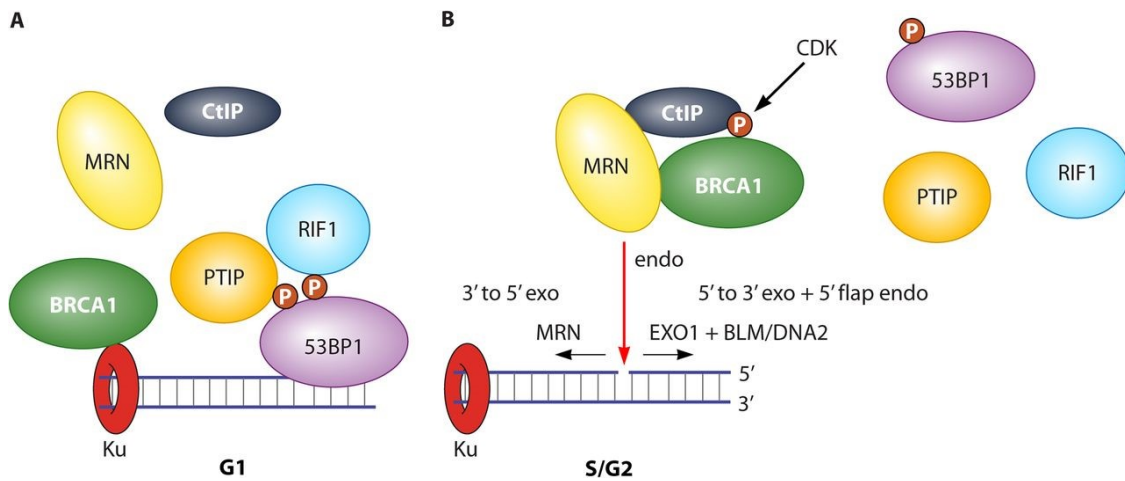


Figure 13: Modèle des voies de réparation en G1, S-G2

(A) Lorsque les cellules sont en phase G1, la protéine ATM phosphoryle 53BP1 et permet sa relocalisation au niveau du dommage, les protéines RIF1 et PTIP s'associent à 53BP1 et bloquent la resection par un mécanisme inconnu, Ku80 détecte les lésions et la quantité de BRCA1 en G1 ne suffit pas à dissocier Ku80 du dommage, (B) lorsque la cellule progresse en phase S, l'activation des Cdk permet la phosphorylation de CtIP qui forme un complexe avec le MRN et BRCA1, ce complexe décroche Ku80 et initie la resection (d'après (Daley and Sung, 2014)).

4.4 Les différents mécanismes de réparation des CDBs

4.4.1 La résection

Une fois la CDB reconnue, la résection peut être initiée, cette étape consiste en la dégradation d'un des deux bouts francs de la lésion double brin grâce à une activité nucléasique 5'-3' afin de créer une extrémité ssDNA dont la longueur déterminera le choix du type de réparation (HR versus Alt-NHEJ). Le MRN, BRCA1 et CtIP sont les protéines initiatrices de ce mécanisme. L'interaction CtIP-MRN augmente l'activité nucléasique de Mre11, elle est régulée par la phosphorylation de CtIP par Cdk2 en phase S sur le site S327, qui permet son association avec le complexe MRN mais également avec BRCA1. BRCA1 ubiquitine CtIP qui se relocalise au niveau du dommage, le complexe MRN-CtIP-BRCA1 peut initier la résection via l'activité endo et exonucléasique de Mre11, permettant la formation d'un substrat ssDNA (You and Bailis, 2010). La deuxième étape de la résection consiste en la prise en charge du ssDNA par d'autres enzymes, soit l'exonucléase Exo1, soit l'hélicase BLM et la nucléase DNA2 (Gavel 2008, Nimonkar 2001). La protéine BLM joue un rôle primordial à

cette étape de la réparation, en effet la résection est l'évènement initiateur de la recombinaison homologue, mais il a récemment été montré que l'accumulation de ssDNA au site de résection pouvait également initier le Alt-NHEJ, qui est un mécanisme « infidèle » et par conséquent source de translocations chromosomiques. L'équipe de Bernard Lopez a mis en évidence l'importance de la protéine BLM dans la maintenance de la stabilité génomique *via* la régulation de la réparation par Alt-NHEJ au site de résection (Grabarz et al., 2013) en montrant que BLM avait deux rôles opposés en fonction de la phase du cycle cellulaire. En G1 et en présence de 53BP1, la protéine BLM réduit la résection CtIP-Mre11 dépendante afin d'éviter le Alt-NHEJ alors que en phase S, et en l'absence de 53BP1, préalablement décroché par BRCA1, BLM facilite la résection afin de promouvoir la réparation par HR (Grabarz et al., 2013). La résection en phase S est également augmentée par l'activité Cdk1 et 2 qui phosphorylent Exo1 sur 4 sites différents (Tomimatsu et al., 2014), initiant la réparation par HR.

4.4.2 La recombinaison homologue

Suite à la résection, le HR se fera en plusieurs étapes : 1) formation des filaments de RPA puis Rad51 sur l'ADN simple brin, 2) recherche d'homologie, formation de la boucle-D, 3) invasion de brin par les ADN polymérases et formation ou non de jonctions de Holliday et 4) résolution des jonctions de Holliday.

La protéine RPA se lie à l'ADN simple brin avec une affinité très élevée, cette étape protège l'ADN de l'action des nucléases et évite la formation de structures secondaires. En effet, l'inhibition de RPA réduit fortement le recrutement de Rad51 et la fréquence de réparation par recombinaison homologue après traitement au HU (Sleeth et al., 2007). Rad52 interagit aussi avec RPA, formant un co-complexe au niveau du ssDNA, qui servira de plateforme au recrutement de Rad51, qui est également facilité par les protéines BRCA1 et BRCA2. La formation du nucléofilament de Rad51 permet la recherche d'homologie de séquence sur la chromatide sœur (Renkawitz et al., 2013), cette invasion du brin endommagé dans les brins de la chromatide sœur est effectué par les polymérases, formant la boucle D (**Figure 14**) (Sebesta et al., 2013). A cette étape, deux options sont possibles : soit la boucle se dissocie en présence des protéines RTEL ou BLM et se réhybride avec l'ADN complémentaire, la brèche est ensuite comblée et les extrémités reliées, la recombinaison homologue est dite sans échange de brins (Kikuchi et al., 2009; Uringa et al., 2011) ; soit l'invasion de brin forme des jonctions de Holliday (**Figure 14**), qui peuvent être résolues par le complexe BLM-TOPOIII-RMI1-RMI2 (qui permet la dissolution sans échange de brins) ou par les résolvasés SLX1

SLX4 MUS81 EME1 qui clivent les jonctions avec ou sans échange de brins (Wyatt and West, 2014).

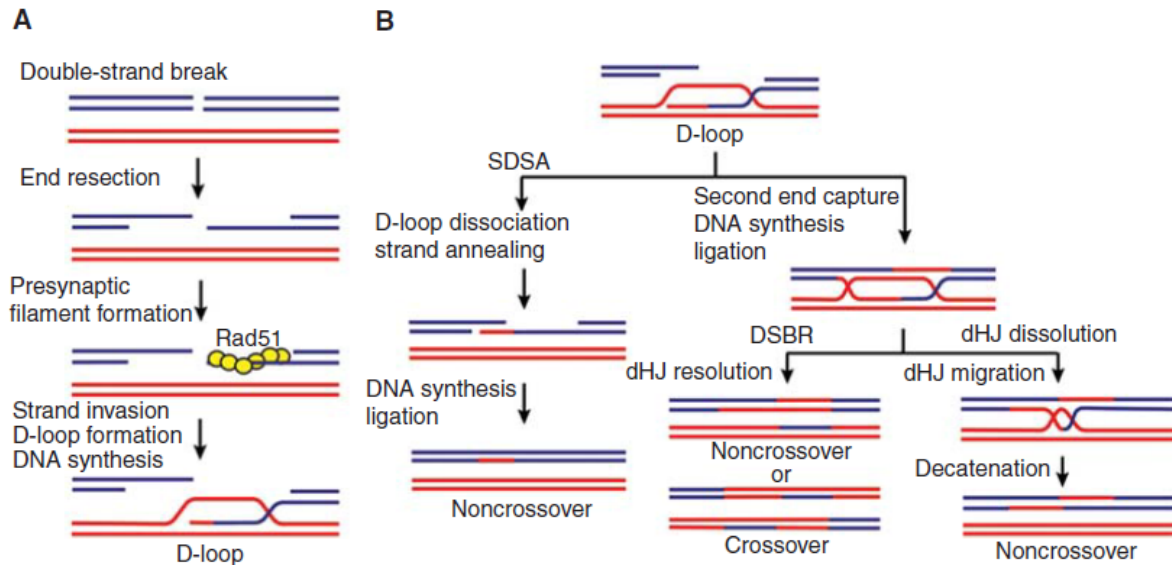


Figure 14: Les étapes de la réparation par recombinaison homologue

(A). La résection permet la formation d'extrémités 3' sur lesquelles Rad51 formera un nucléofilament, permettant l'invasion des brins par la boucle-D (B). La boucle D peut dissocier sans échange de brin ou évoluer en jonctions de Holliday qui sera résolue en présence des résolvases avec ou sans échange de brins (Daley et al., 2014).

4.4.3 Mécanisme de réparation des CDBs par «Single Strand annealing» (SSA)

Un mécanisme alternatif au HR peut réparer les CDBs, le plus souvent dans des contextes Rad51 et BRCA2 mutés, ce processus partage plusieurs effecteurs communs avec le HR (Figure 15). Il est initié par la résection et la formation d'ADN simple brin lié à RPA, la fonction endonucléase 5'3' du complexe XPF-ERCC1 permet d'éliminer la séquence non homologue des deux brins complémentaires, enfin la religation se fait par la ligase 3 (Liu et al., 2014).

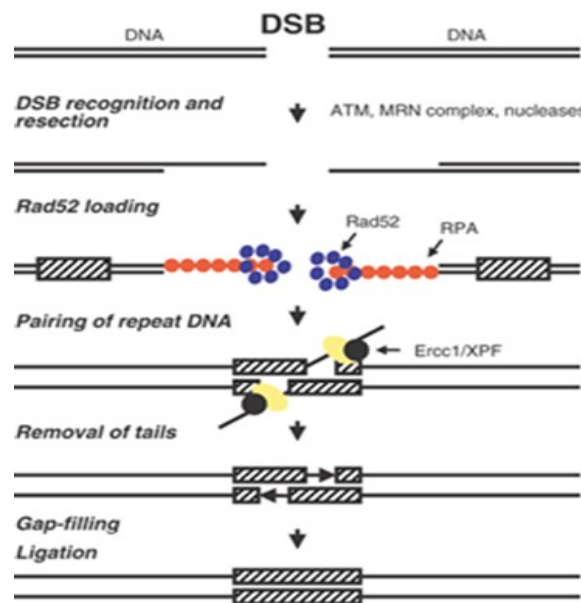


Figure 15: Mécanismes de réparation des CDBs par « Single Strand Annealing »

La formation d'ADN simple brin se fait en présence de la nucléase Mre11, la longueur de l'ADN simple brin déterminera les protéines intervenant dans le SSA. Dans le cas de longues régions simple brin, RPA et Rad52 sont nécessaires pour faciliter le rapprochement des extrémités, celles-ci seront excisées par ERCC1/XPF, les séquences manquantes seront synthétisées puis liguées, afin de restaurer une séquence répétée complète (d'après (Maggiorella et al., 2003)).

4.4.4 La réparation par Jonction d'Extrémités Non Homologues (NHEJ)

La recombinaison par suture non homologue (NHEJ) (**Figure 16**) est le mécanisme majoritaire de réparation des CDB, il peut avoir lieu tout au long du cycle cellulaire, car contrairement au HR il ne requiert pas d'homologie de séquence, le NHEJ "classique" (C-NHEJ) nécessite le complexe DNA-PK. Ce processus commence par la reconnaissance de la cassure par le complexe senseur Ku (Ku70/Ku80). Cet hétérodimère qui possède une structure en anneau est capable d'entourer l'ADN sur environ deux tours d'hélice. La partie C-terminale de Ku80 possède douze résidus protéiques interagissant directement avec DNA-PKcs (Williams et al., 2014). L'association de DNA-PKcs à l'ADN suffit à son activation, mais son activation est augmentée de façon significative lorsqu'elle est liée au complexe Ku, suggérant que cette interaction est primordiale à l'activation optimale de la protéine (Chiruvella et al., 2013). Ku recrute également le complexe composé de XLF, XRCC4 et Ligase4 (LIG4) qui va permettre la ligation de l'ADN. XLF n'a pas d'activité enzymatique mais permet de stabiliser le complexe XRCC4/LIG4 et d'augmenter son activité par la re-adenylation de la LIG4 suite à la ligation (Ochi et al., 2014). De plus, XLF et XRCC4 forment un filament qui facilite la ligation des brins. Lorsque la structure de l'ADN ne permet pas une

ligation directe, d'autres protéines facilitant le processing de l'ADN peuvent être recrutées : APLF qui facilite la rétention du complexe XLF/XRCC4/LIG4, Artémis et WRN qui permettent la résection avant la ligation (et dans certains cas l'ouverture de la structure en forme d'épingle à cheveux), ou encore les PNKP (PolyNucléotides Kinase-Phosphate) et Ku qui ont la capacité d'éliminer les sites abasiques (Liu et al., 2014).

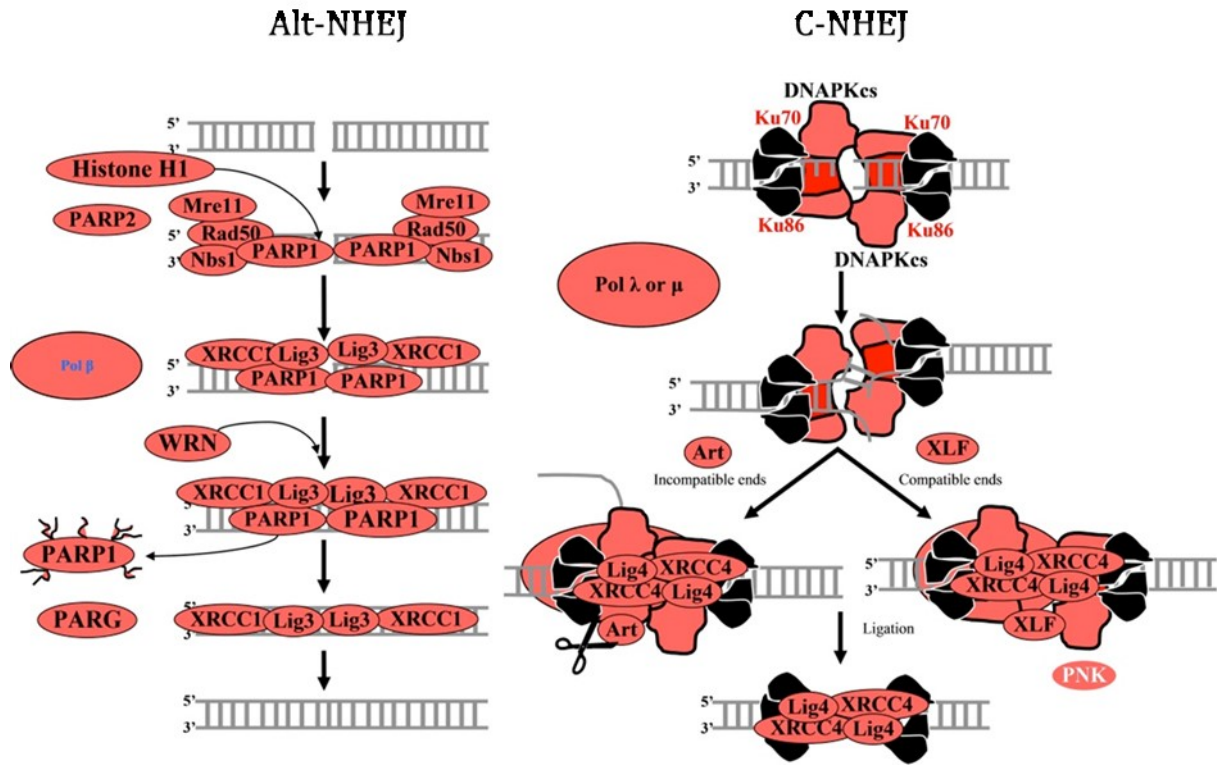


Figure 16: La réparation par jonction non homologue classique (C-NHEJ) et alternatif (Alt-NHEJ)

Le C-NHEJ est initié par l'hétérodimère Ku70/Ku80, le complexe Ku70/Ku80 recrute la kinase DNA-PKcs. En cas de formation de structures secondaires, XLF et Artémis permettent la résection avant la ligation. L'étape de synthèse se fait en présence des ADN polymérases μ et λ et le complexe XRCC4-LIG4-XLF permet la religation des brins. Dans le cas du Alt-NHEJ, la cassure est reconnue par la PARP-1, le complexe MRN, CtIP et BRCA1 effectuent la résection de l'ADN au niveau de la cassure et l'étape de la ligation se fait par l'association ligase 3/XRCC1 ou par la ligase 1 (D'après (Denis, 2011)).

4.4.5 La réparation par NHEJ alternatif (Alt-NHEJ)

Ce mécanisme est actif tout au long du cycle cellulaire, il partage l'étape de la résection avec le HR. Le travail de Guirouilh-Barbat en 2008 avait permis d'observer une augmentation de la réparation par Alt-NHEJ en phase S (Guirouilh-Barbat et al., 2008). Ces résultats ont été confirmés par les récents travaux de Truong *et al.* qui montrent que ce mécanisme de réparation peut être actif en présence du HR et du NHEJ, qu'il est augmenté en phase S de

façon Cdk2 et CtIP dépendante, et qu'il est induit en réponse au stress réplcatif par à un traitement au HU de 24 et 36h (2mM) (Truong et al., 2013).

Ce mécanisme implique les effecteurs PARP-1 et XRCC1/Ligase III (**Figure 16**). Cette voie s'appuie sur la première étape de la résection (pas plus de 50pb) qui permet l'identification de séquences de micro-homologies allant de 2 à 8 nucléotides (Grabarz et al., 2012). Ces régions s'hybrident et forment une structure intermédiaire. En plus de son rôle dans la reconnaissance du dommage, la PARP-1 est nécessaire à l'accomplissement du Alt-NHEJ par le recrutement de XRCC1 et de la ligase III, qui effectue la ligation des brins (Audebert et al., 2004; Audebert et al., 2006; Liu et al., 2014). Ce mécanisme de réparation est une source majeure de translocations, de ce fait la régulation de la résection au cours du cycle est primordiale pour la stabilité génomique.

4.5 Spécificités de la réparation liée à la fourche de réplication

4.5.1 Blocages de fourches et CDBs dues à l'hydroxyurée

Il a été montré que l'utilisation de HU à une même concentration (2mM) dans des cellules U2OS avait un effet différent sur la fourche de réplication en fonction du temps de traitement et faisait intervenir deux mécanismes Rad51 dépendants distincts (Petermann et al., 2010). Les traitements dits « courts » d'une à deux heures entraînent un blocage de fourche (« stalling ») alors qu'une utilisation du HU sur un temps plus long (à partir de 18h de traitement) induit des CDBs (mesurées par PFGE, Pulsed-field gel electrophoresis) souvent associées à l'effondrement de la fourche (« collapse ») qui sont prises en charge par le HR (Lundin et al., 2002; Petermann et al., 2010). Contrairement aux cellules humaines, ce phénomène d'induction de CDBs après HU n'est observée chez la levure que lorsqu'elle est mutée pour les protéines du point de contrôle de la phase S (Hanada et al., 2007; Saintigny et al., 2001).

On définit un « stalling » de fourche comme un ralentissement ou un arrêt de la fourche de réplication mais durant lequel tous les éléments de la fourche restent assemblés, la protégeant de la formation de structures secondaires, ce qui permet au réplisome de redémarrer. A l'inverse, lorsqu'une fourche « collapse », les éléments du réplisome se dissocient et une intervention du HR est nécessaire pour son redémarrage (Lambert and Carr, 2013b). Le mécanisme qui entraîne un collapse de fourche et une accumulation de cassures suite à un « stalling » a fait l'objet de plusieurs recherches cette dernière décennie mais n'est pas encore complètement défini. Il a été proposé que le désassemblage du réplisome a lieu après un traitement HU lorsque le point de contrôle en phase S est déficient (Branzei and Foiani, 2010;

Cobb et al., 2005) ; cependant d'autres études ont montré que le réplisome restait intact après un traitement au HU dans des mutants de levures (De Piccoli et al., 2012). L'une des explications possibles serait que le réplisome reste intact mais qu'il se déplace, exposant ainsi l'ADN nouvellement synthétisé aux éxo/endonucléases et entraînant un effondrement de fourche irréversible associé à une cassure double brin (Yeeles et al., 2013). Une autre explication serait qu'au niveau d'un réplisome dissocié, l'hélicase peut continuer à séparer les brins parentaux et générer de l'ADN simple brin.

La dissociation du réplisome a pour conséquence l'accumulation d'intermédiaires de réplication qui seront des initiateurs de la recombinaison homologe. Par conséquent le HR joue un rôle fondamental dans la progression de la réplication en agissant à plusieurs niveaux : il peut prendre en charge le ssDNA accumulé suite à une dissociation du réplisome, il protège l'ADN néosynthétisé d'éventuels résections, et il a récemment été suggéré comme acteur dans la reconstruction d'un réplisome après effondrement, permettant le redémarrage de la fourche (Carr and Lambert, 2013).

4.5.2 Prise en charge des cassures induites à la fourche

La recombinaison homologe (HR) escorte la machinerie de réplication tout au long de la phase S. L'inhibition de l'expression de Rad51 dans des cellules de poulet entraîne l'accumulation de cassures chromosomiques suite à la réplication, ce qui montre bien que le HR est requis au cours de la progression normale en phase S (Helleday, 2003). Après déstabilisation de la fourche par un traitement court au HU, Rad51 forme des foyers au niveau de la fourche sans pour autant induire le HR. Ces foyers seraient associés à la régression de la fourche qui faciliterait la formation de jonctions de Holliday et le redémarrage de la fourche. Ce mécanisme bien décrit chez les bactéries et les levures est appelé Réplication Induite Par les Cassures (BIR pour Break Induced Repair). Ce type de réparation spécifique de la fourche de réplication prend en charge les CDBs caractérisées par la présence d'homologies de séquence à une seule extrémité de la cassure. Dans ce cas précis l'extrémité de la CDB envahit le brin homologue et initie la synthèse, formant une structure en boucle qui permet de restaurer la fourche de réplication et forme des jonctions de Holliday qui seront ensuite résolues (Helleday, 2003). Chez les mammifères, la preuve formelle de l'existence de ce type de réparation n'a pas été faite. Cependant le travail récent de Costantino *et al.* (Costantino et al., 2014) utilisant un nouveau plasmide fluorescent ayant la capacité de mesurer la réparation par BIR, a permis d'identifier la polymérase POLD3, orthologue de Pol32 chez *S. cerevisiae*, comme facteur de réparation par BIR chez l'Homme. Il suggère que l'observation de

duplication génomique dans certains cancers surexprimant POLD3 serait due à son activité dans le BIR à la fourche de réplication qui est connue pour être très mutagène (Deem et al., 2011).

4.5.3 Le redémarrage de la fourche de réplication

Les mécanismes par lesquels le HR assure la protection et le redémarrage de la fourche de réplication chez les mammifères sont encore mal connus. Plusieurs protéines ont toutefois été identifiées comme essentielles à ce processus. Il a notamment été montré que PARP-1 était requise pour le recrutement et la formation de foyers Mre11 au niveau de la fourche de réplication (Bryant et al., 2009). Le recrutement de Mre11 est critique pour le redémarrage de la fourche puisqu'il contribue à la résection des structures intermédiaires et à l'initiation de la recombinaison homologue (Williams et al., 2008). BRCA1, FANCD2 et BRCA2 sont également recrutées afin de protéger la fourche d'une résection excessive Mre11 dépendante (Yeo et al., 2014; Ying et al., 2012) et le recrutement de BRCA2 permet celui de Rad51 qui est requis pour la réparation des CDBs à la fourche (Petermann et al., 2010). Ces deux fonctions de protection et de réparation HR dépendantes de Rad51 sont distinctes, même si elles font intervenir plusieurs protéines communes. Par exemple le recrutement de Rad51 sur le ssDNA est suffisant pour induire la réparation par HR, alors que la stabilisation de la fourche exige un nucléofilament de Rad51 stablement accroché à la partie C-terminale de BRCA2.

Il a également été suggéré que les cellules eucaryotes ont la capacité d'éviter le redémarrage de la fourche de réplication par l'initiation d'origines dormantes adjacentes à la fourche (Branzei and Foiani, 2007; Paulsen and Cimprich, 2007). Cette observation avait été confirmée par les travaux de Petermann *et al.* qui montrent qu'après un traitement de 24h au HU les cellules ont tendance à initier de nouveaux événements et non à redémarrer les fourches bloquées (Petermann et al., 2010).

5. RPA : une protéine multifonctionnelle essentielle au maintien de l'intégrité du génome

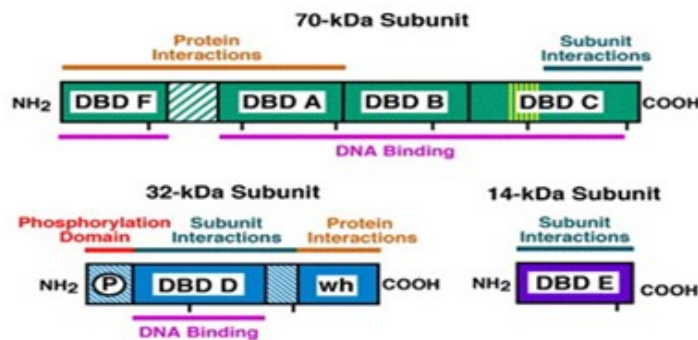
5.1 Structure et fonctions

La protéine RPA est composée de trois sous-unités RPA1 RPA2 et RPA3, respectivement de 70, 32 et 14 kDa. Cette protéine est très conservée chez les eucaryotes et possède une très haute affinité avec l'ADN simple brin, elle a tout d'abord été identifiée pour son rôle dans la réplication, mais s'est avérée impliquée également dans l'initiation de nouvelles origines de

réplication, et dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue et par excision de base. La multifonctionnalité de cette protéine est due à la diversité des substrats interagissant avec ses trois sous unités mais aussi aux différentes régulations post traductionnelles qu'elle peut subir.

L'hétérotrimère RPA possède sept structures en feuillets pouvant se lier à l'ADN simple brin appelés « OB folds » (Oligo-saccharide/oligo nucléotide Binding fold), quatre sont localisés sur le polypeptide RPA70 et annotés DBD (pour DNA Binding domain) F, A, B et C (**Figure 17**). Les domaines A et B interagissent fortement avec l'ADN et le domaine C est requis pour l'hétérotrimérisation de la protéine. Les sous unités 32 et 14 kDa possèdent également chacune un OB, nommés DBD D et DBD E respectivement, toutefois aucune interaction de ces domaines n'est requise pour l'interaction de l'hétérodimère à avec l'ADN La sous-unité RPA 32 possède un domaine de phosphorylation N-terminal qui permet la régulation fonctionnelle du complexe (Binz et al., 2004; Oakley and Patrick, 2010).

(A)



(B)

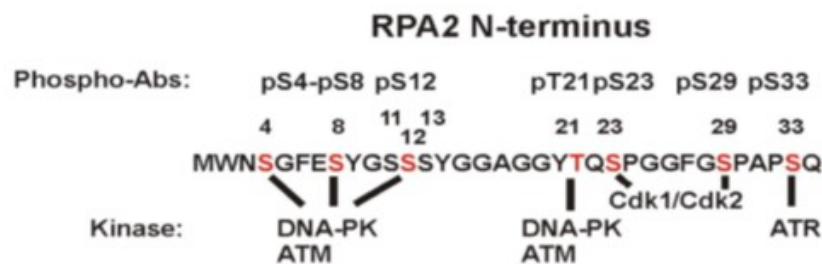


Figure 17: Représentation des différents domaines de la protéine RPA

(A) Représentation schématique des différentes sous unités de la protéine RPA et des domaines de liaison à l'ADN (DBD) de l'hétérotrimère d'après (Binz et al., 2004). (B) Représentation du domaine N-terminal de la protéine RPA2 et des différentes kinases impliquées dans sa phosphorylation (d'après (Oakley and Patrick, 2010)).

5.2 Rôles de la protéine RPA

L'identification et la compréhension du rôle de la protéine RPA dans la réplication ont été possibles grâce à l'étude de la réplication du virus SV40 (Fairman and Stillman, 1988; Wold and Kelly, 1988). Dans ce système qui requiert la fonction hélicase de l'antigène T du virus, il a été montré que la protéine RPA était recrutée par l'antigène T pour stabiliser l'ADN simple brin et le protéger d'éventuels nucléases (Wold and Kelly, 1988). Il a également été montré que la protéine RPA s'associe au complexe de réplication suite à l'initiation du complexe pré-réplcatif par Cdc45, et facilite l'ouverture des deux brins parentaux mais ne possède pas d'activité hélicase. Lors de l'initiation de la réplication, RPA facilite le recrutement, le « switching » et la stabilisation des ADN polymérases, puis stimule leur activité tout au long de l'élongation de la réplication (Binz et al., 2004; Oakley and Patrick, 2010; Yuzhakov et al., 1999).

La protéine RPA est également impliquée dans la reconnaissance des dommages et l'activation du point de contrôle en phase S, elle permet la relocalisation d'ATR au site de dommages et l'activation de Chk1 (Binz et al., 2004).

La phosphorylation de la protéine RPA semble également nécessaire à la recombinaison homologue suite à un stress réplicatif, elle est requise pour le recrutement de la protéine Rad51 et l'initiation du HR après traitement HU (Shi et al., 2010). Elle protège l'ADN après sa résection en évitant la formation de structures secondaires (Chen et al., 2013) et permet, par la suite, le recrutement de la protéine Rad52 par une interaction protéine-protéine qui décroche RPA et facilite le recrutement de Rad51 (Park et al., 1996; Sugiyama and Kowalczykowski, 2002). Enfin, RPA interagit également avec la protéine BRCA2 qui joue un rôle majeur dans la relocalisation de Rad51 au cours de la recombinaison homologue (Liu et al., 2010).

En plus de ses fonctions dans la réplication, la signalisation des dommages et la recombinaison, la protéine RPA est également impliquée dans d'autres mécanismes de réparation (**Figure 18**), notamment dans la réparation par excision de Nucléotide (NER) où elle intervient dans différentes étapes (Sancar, 1996; Wood, 1997) : elle contribue à la reconnaissance du dommage par son affinité élevée pour le ssDNA et son interaction avec la protéine XPA (He et al., 1995; Stigger et al., 1998), il a été suggéré qu'elle aurait un rôle dans la stabilisation du complexe de réparation et dans la stimulation de l'activité endonucléase du complexe XPF-ERCC1 et enfin, elle coordonne la synthèse post-réparation (Oakley and Patrick, 2010).

Au cours de la réparation par BER, qui se fait par l'action de glycosylases qui reconnaissent et éliminent le dommage, RPA semble interagir avec l'Uracil-glycosylase. Il a également été montré que la protéine RPA privilégie la voie du « Long Patch » qui constitue une des deux voies du BER, par l'extension d'ADN simple brin, et qu'elle stimule la ligase I, requise pour l'étape finale de réparation par BER. RPA est aussi impliquée dans la réparation par MMR, dans laquelle elle reconnaît et protège l'ADN simple brin et stimule l'activité de l'exonucléase lorsqu'un mésappariement est présent (Oakley and Patrick, 2010).

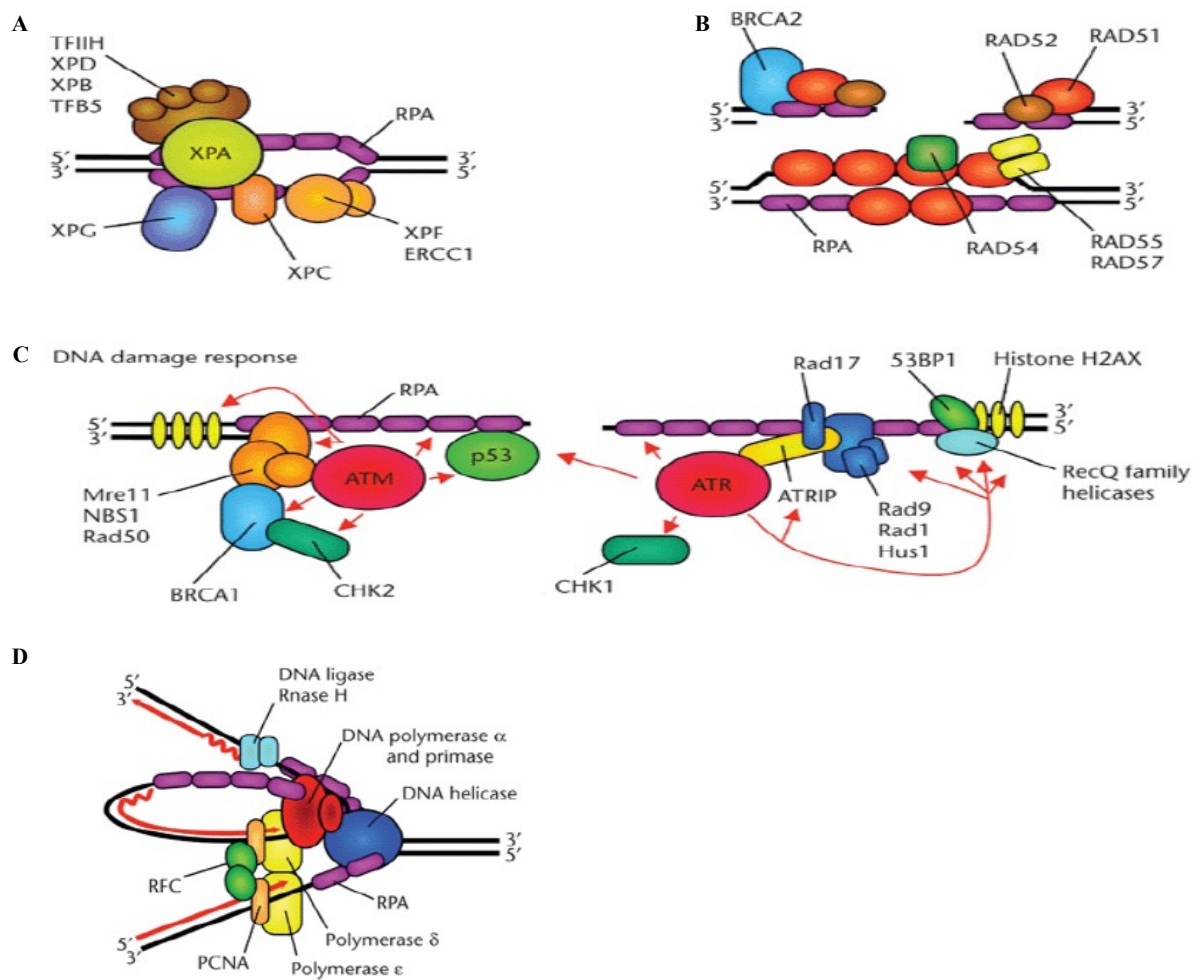


Figure 18: Les différentes fonctions de la protéine RPA

(A) Dans la réparation par NER RPA reconnaît et facilite la réparation. (B) Dans la réparation par recombinaison homologue (C) Dans la réponse aux dommages, elle initie les cascades de signalisation ATR dépendantes et peut également interagir avec p53 et être la cible d'une phosphorylation ATM dépendante. (D) RPA facilite l'initiation et l'élongation de la réplication (d'après (Humphreys, 2010)).

5.2.1 Régulation de la protéine RPA et impact sur ses différentes fonctions

La régulation de la protéine RPA passe par la phosphorylation de sa sous unité RPA2. Ces phosphorylations peuvent être stimulées par plusieurs facteurs : la progression dans le cycle cellulaire, les dommages de l'ADN, l'accumulation de fourches bloquées, ou encore les cassures de l'ADN. L'impact de ces phosphorylations sur les fonctions cellulaires de la protéine RPA n'est pas complètement défini mais plusieurs études ont permis de comprendre certains aspects régulateurs de ces phosphorylations.

A la transition G1/S et en absence de dommages, Cdk2 phosphoryle la protéine RPA sur la sérine 23, l'activation de la kinase Cdk1 au cours de la mitose augmente le niveau de cette phosphorylation, et permet la phosphorylation de la sérine 29 (Anantha et al., 2008; Anantha et al., 2007; Stephan et al., 2009). Dutta et Stillman furent les premiers à montrer cette phosphorylation phase dépendante dans les cellules humaines, suggérant que ces phosphorylations contribueraient à l'initiation de la réplication (Dutta and Stillman, 1992). Cependant les travaux de Fotedar et Roberts montrent que la phosphorylation de la protéine RPA n'est pas nécessaire pour son interaction avec l'ADN simple brin, et que ces phosphorylations seraient probablement requises à la suite de l'initiation du complexe de réplication (Fotedar and Roberts, 1992).

En réponse aux dommages, d'autres sites sont phosphorylés, les travaux d'Anatha *et al.* ont montré, par l'utilisation de plasmides mutés sur différents sites de la sous unité 2, que la protéine RPA était phosphorylée *in vivo* de manière séquentielle. En effet, l'interaction de l'hétérotrimère RPA à l'ADN simple brin suite à un traitement à la CPT active ATR qui phosphoryle la sous unité 2 sur la sérine 33

Figure 19) et cette phosphorylation est suivie de la phosphorylation des sérines 23 et 29 par Cdk1 et Cdk2, la mutation de ces deux sites réduisant fortement la phosphorylation ATR dépendante. Ces événements initiateurs stimulent la phosphorylation du site Thr 21 probablement par la DNA-PK et l'ensemble de ces phosphorylations permet l'hyperphosphorylation de la protéine RPA sur les sérines 4 et 8 qui serait majoritairement DNA-PK dépendante. Cela conduit à une stimulation des protéines RPA adjacentes en *trans* et leur hyperphosphorylation (Anantha et al., 2007). Plusieurs types de traitements peuvent induire la phosphorylation de ces sites notamment la CPT, l'aphidicoline, le HU, les radiations UV et les RI (Liu and Weaver, 1993; Shao et al., 1999; Zernik-Kobak et al., 1997). De plus l'hyperphosphorylation de la protéine RPA coïncide avec la réparation par RH. En effet, le traitement des cellules en phase G1, S et G2 à la Bléomycine, une drogue induisant des CDB, montre que la forme hyperphosphorylée de la protéine est retrouvée en fin de phase

S et début de G2, lorsque la RH est maximale, suggérant que l'hyperphosphorylation de la protéine RPA serait un marqueur de résection de l'ADN (Anantha et al., 2007).

Plusieurs études suggèrent que les fonctions de la protéine RPA seraient régulées par cet état d'hyperphosphorylation, cette forme aurait une affinité réduite pour les domaines de réplication. Ce résultat a été démontré *in vivo* par l'utilisation de plasmides mimant l'état hyperphosphorylé de la protéine dans des cellules humaines, après traitement à la CPT ; de façon intéressante, la protéine RPA hyperphosphorylée ne colocalise plus avec les foyers BrdU mais ne perd pas son affinité pour les foyers d'ADN endommagé, suggérant que l'état hyperphosphorylé de RPA stimulerait sa fonction de réparation (Vassin et al., 2004). En présence d'UV, l'hyperphosphorylation de la protéine RPA a également été associée à l'arrêt du cycle cellulaire et au ralentissement de la réplication (Olson et al., 2006); le mécanisme précis par lequel l'hyperphosphorylation de RPA réduit l'activité répllicative n'est pas défini, une des possibilités serait que son affinité pour les ADN polymérases serait réduite (Binz et al., 2004; Patrick et al., 2005).

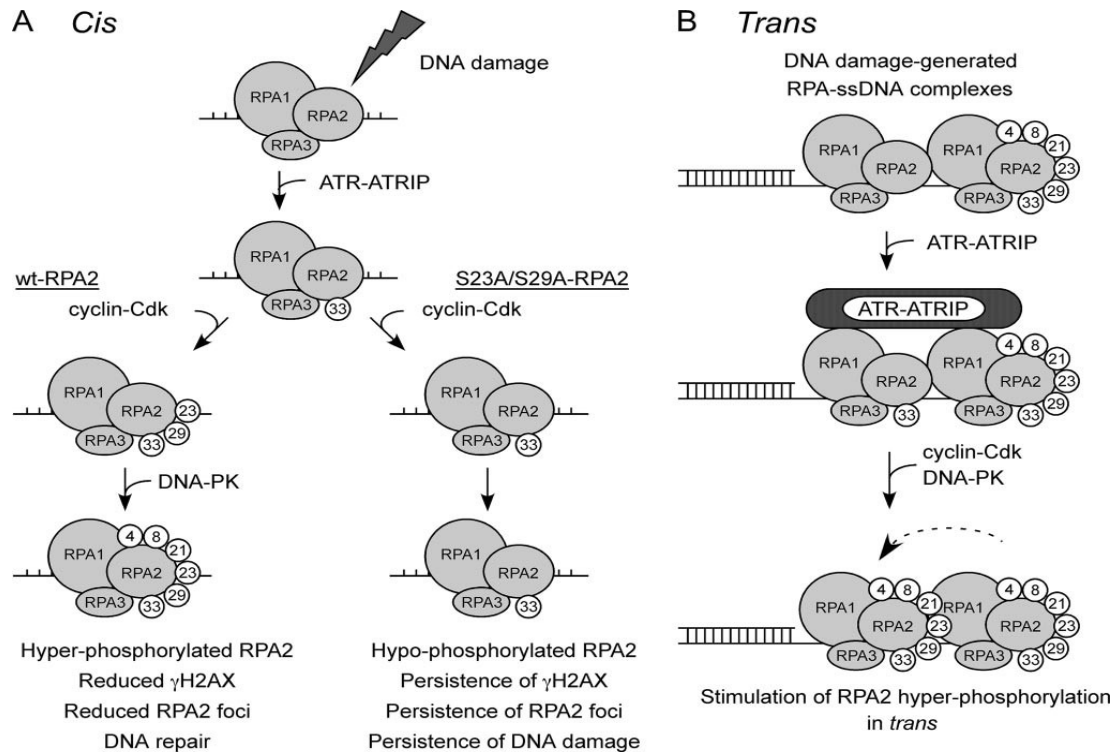


Figure 19: Modèle de la phosphorylation de la protéine RPA en réponse à la CPT et impact en *cis* et en *trans*.

La protéine RPA interagit avec l'ADN simple brin formé au cours du dommage, elle est phosphorylée par ATR sur le site S33. Cette phosphorylation sert de substrat pour d'autres modifications de la protéine, par les Cdk sur les sites S29 S23, puis par la kinase DNA-PK sur les sites S4 S8 et Thr21 et probablement sur les sites S11 S12 S13. L'hyperphosphorylation de la protéine RPA agit également en *trans* sur d'autres molécules RPA (D'après (Anantha et al., 2007)).

Chapitre 2 : La kinase dépendante des cyclines-5 : Cdk5

1. La famille des Cdks

Les Cdks sont des sérines thréonines kinases qui contrôlent une multitude d'évènements tout au long du cycle cellulaire. C'est en 1991, au cours d'un symposium sur le cycle cellulaire qu'il a été convenu que la dénomination Cdk serait donnée à toute kinase ayant les deux critères suivant : une forte homologie avec Cdk1, et la capacité à interagir avec les cyclines (Meyerson, Enders et al. 1992). Basée sur l'homologie de séquence, la famille des Cdks chez l'homme est actuellement composée de 21 gènes codant des Cdks et 5 gènes codant des kinases « Cdk-like » (Cdkls). Cette nomenclature est basée sur la classification fonctionnelle qui regroupe les 13 premières Cdks (Cdk1-Cdk13). Les autres Cdks et Cdkls ayant en commun un site prédictif permettant l'interaction avec les cyclines (PSSLARE ou PCTAIRE) ou simplement une homologie de séquence avec les premières Cdks identifiées (**Figure 20**) (Malumbres et al., 2009). La caractérisation fonctionnelle des Cdks se base également sur la présence d'un motif riche en Glycine et d'une structure en T-loop bien conservée chez les eucaryotes (Guo and Stiller, 2004).

2. Fonctions générales des Cdks

Les Cdks possèdent plusieurs rôles dans la cellule, des analyses fonctionnelles dans différentes espèces ont pu les classer en sous-groupes (Guo and Stiller, 2004). Les six premières Cdks (Cdk1-Cdk6) sont essentiellement associées à la progression et au contrôle du cycle cellulaire.

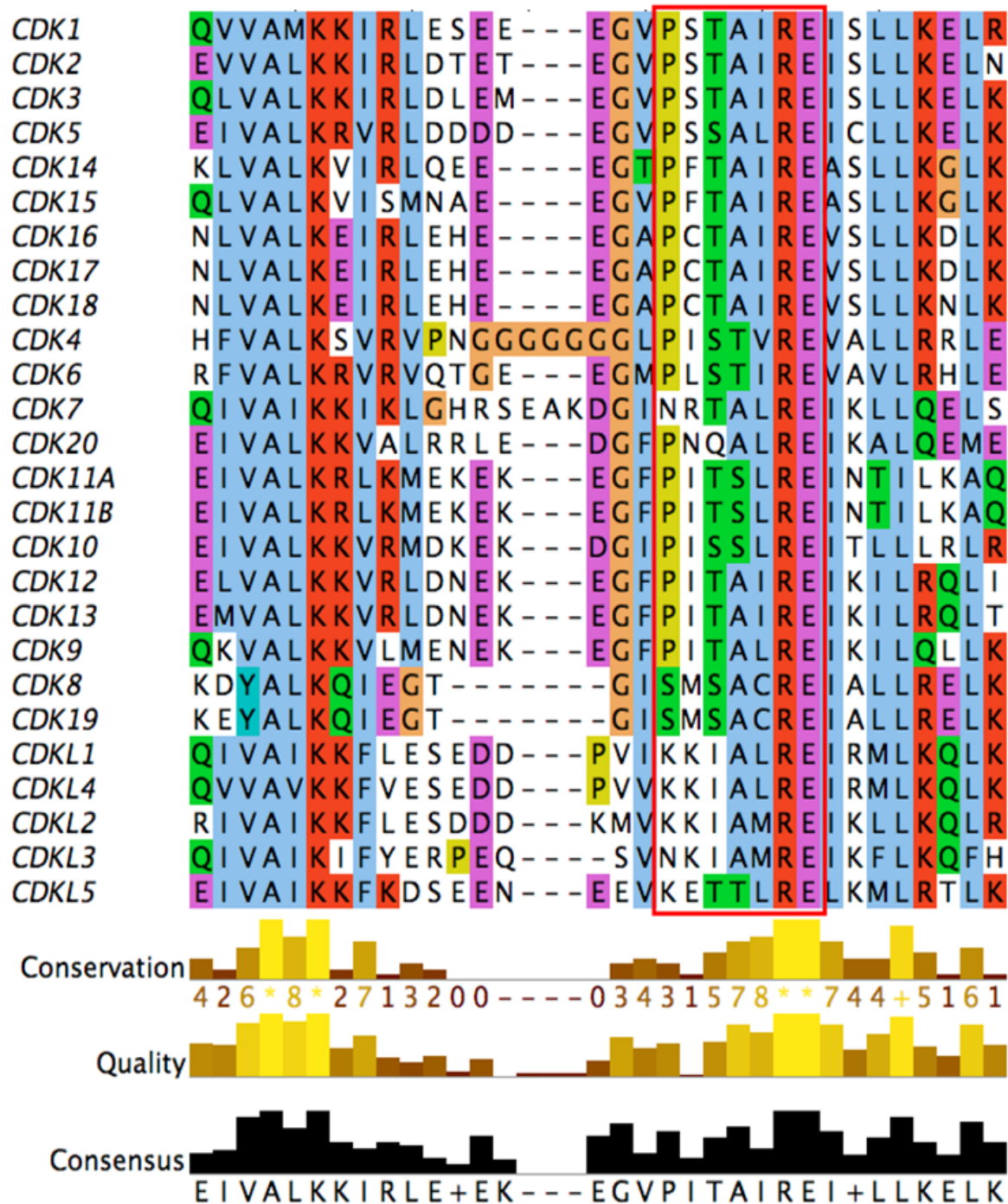


Figure 20: Sites prédictifs des Cdks et des protéines Cdks Like

Les séquences protéiques sont représentées, le site prédictif d'interaction avec les cyclines correspond à l'encadré rouge (d'après (Malumbres et al., 2009)).

Cependant, certaines Cdks de ce groupe se sont avérées avoir également un rôle dans la régulation de la réparation (Wohlbold and Fisher, 2009) et dans la transcription (Courapied et al., 2010). Les protéines du groupe des Cdk7 et Cdk7-like kinases possèdent une activité appelée « CAK » (Cdk Activating Kinases) permettant d'activer les Cdks du cycle et jouent

un rôle dans la transcription. Les groupes des Cdk8 et Cdk9 jouent également un rôle dans la transcription *via* la phosphorylation du domaine dit « CTD » de l'ARN polymérase II (Guo and Stiller, 2004; Hirose and Ohkuma, 2007). Le rôle des Cdk10 et Cdk11 n'est pas encore clairement défini, mais elles ont aussi été associées à la transcription (Kasten and Giordano, 2001). Enfin Cdk12 et Cdk13, découvertes plus récemment, régulent l'expression de Cdk5 dans les neurones (Chen et al., 2014) et Cdk12 phosphoryle également la RNA polymérase II (Bowman and Kelly, 2014) (**Figure 21**).

Les Cdks font partie des plus petites protéines kinases, leur structure est composée de deux lobes : le N-lobe possédant la séquence PSTAIRE riche en glycine, et le C-lobe composé d'hélices α . Entre ces deux lobes, on retrouve le site de liaison à l'ATP et aux substrats des Cdks. Les résidus impliqués dans la liaison à l'ATP se trouvent sur les deux domaines alors que les résidus importants pour la liaison aux substrats se situent au niveau du domaine C-terminal. Le mécanisme d'activation des Cdks a été compris grâce à la cristallisation du complexe Cdk2/Cycline A. Brièvement, l'interaction de la cycline A avec Cdk2 permet l'ouverture partielle de la boucle terminale « T-loop » (segment activateur qui permet l'accès à l'ATP et aux substrats), ce site n'est complètement ouvert qu'à la suite de la phosphorylation CAK dépendante de la kinase sur la Thr160 (Lim et al., 2001).

3. Cdk5 une Cdk particulière

La cyclin-dependent-kinase 5 (Cdk5) a été découverte en 1992 lors d'un criblage recherchant des identités de séquences avec Cdk1. Elle sera d'abord nommée neuronal cdc2-like kinase (nclk) du fait de sa forte expression dans les cellules neuronales post mitotiques, puis PSSALRE kinase, en référence au domaine PSSALRE caractéristique des Cdks (Meyerson et al., 1992) et ce n'est qu'après la démonstration de son interaction avec la Cycline D qu'elle sera appelée Cdk5 (Xiong et al., 1992). Cdk5 possède 58% et 60% d'homologies de séquence d'acides aminés avec Cdk1 et Cdk2 respectivement, cette similitude se situe surtout au niveau des domaines caractéristiques des kinases. A titre de comparaison, Cdk1 et Cdk2 dont les fonctions cellulaires sont très proches possèdent des séquences similaires à 65% (Hellmich et al., 1992; Lew and Wang, 1995).

La kinase Cdk5 est essentielle pour le développement, les souris Cdk5^{-/-} subissent une mort prénatale associée notamment à un positionnement anormal des neurones dans plusieurs régions du cerveau et du cortex cérébral (Gilmore et al., 1998; Ohshima et al., 1996). La kinase Cdk5 est exprimée de façon ubiquitaire, mais son activité est plus élevée dans les

neurones. Cependant il a été montré que cette activité kinase était présente dans les ovaires de souris, et dans les cellules humaines non neuronales (Lee et al., 2004)

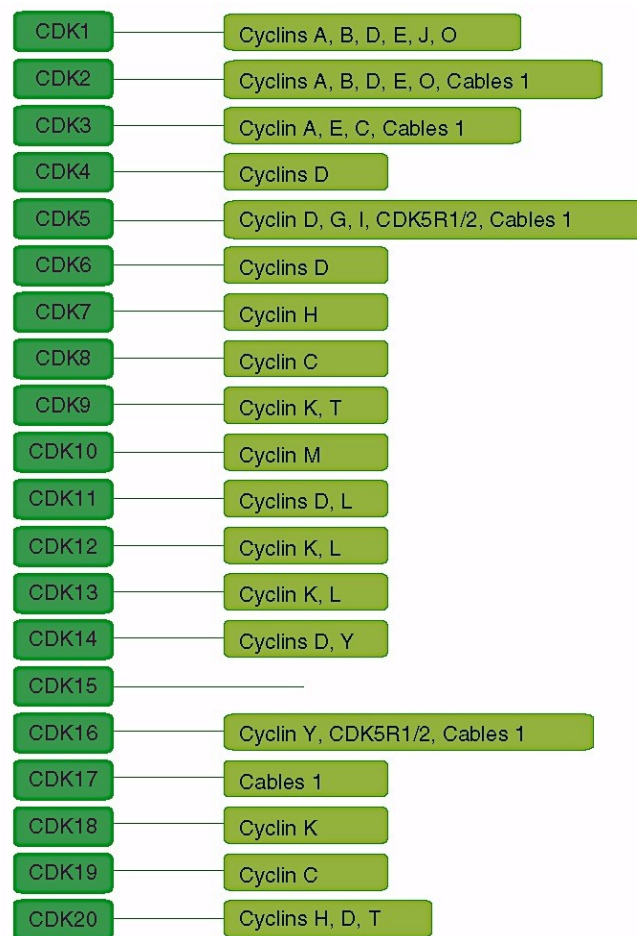


Figure 21: Interaction des Cdk5 avec les cyclines et « cyclines like proteins » (Bruyere and Meijer, 2013).

3.1 Structure de Cdk5

Cdk5 est une protéine de 292 acides aminés, d'un poids moléculaire de 33 KDa, elle est codée chez l'Homme par un gène unique de 12 exons située sur le chromosome 7, dans la région q36 (Demetrick et al., 1994). Tous comme les autres Cdk5, Cdk5 est constituée d'un petit lobe N terminal et d'un grand lobe C-terminal, le lobe N terminal se compose d'un feuillet β et d'une hélice C contenant une séquence polypeptidique PSSALRE, le grand lobe C est composé d'un feuillet α . C'est entre ces deux structures que l'on retrouve le site de liaison à l'ATP, et aux substrats, ainsi qu'une structure en boucle terminale « T-loop » dont l'orientation permet la reconnaissance du substrat (**Figure 22**).

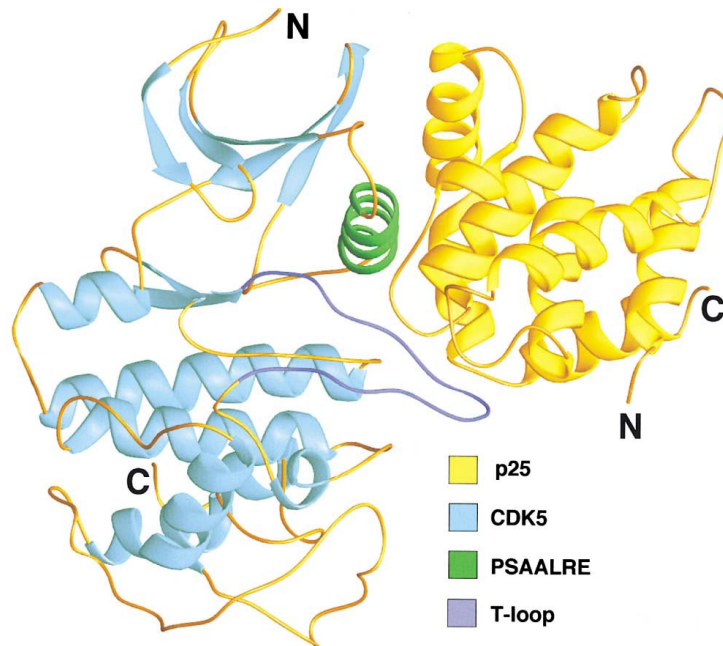


Figure 22: Structure de la kinase Cdk5 lié à p25 (Tarricone et al., 2001)

3.2 Activation de Cdk5

Malgré les similitudes structurales observées entre Cdk5 et les autres Cdks, l'activation de Cdk5 diffère sur certains points que nous abordons ci-dessous.

Contrairement aux autres Cdks du cycle cellulaire qui sont dépendantes des cyclines pour leur activation, Cdk5 est activée par trois partenaires activateurs p39, p35 et p25. Tout comme Cdk5, c'est dans les neurones que ces activateurs sont les plus fortement exprimés, toutefois leur expression est ubiquitaire.

3.2.1 Les protéines p35 et p39

La protéine p35, également appelé Nck5a (Neuronal Cdk5 Activator) a été découverte par co-immunoprécipitation avec Cdk5 dans des extraits neuronaux, il a été démontré que p35 était capable de s'associer et d'activer Cdk5 *in vivo* et *in vitro* (Tsai et al., 1994) ; l'isoforme p39 ou Nck5ai (Neuronal Cdk5 Activator Isoform) a été identifiée par homologie de séquence avec p35 (Tang et al., 1995). Le complexe Cdk5/p39 a été plus difficile à isoler du fait de la fragilité de l'interaction entre les deux protéines, cependant l'activation de Cdk5 par p39 a pu être démontrée (Humbert et al., 2000; Yamada et al., 2007).

Les activateurs p35 et p39 partagent 57% d'identité au niveau protéique et possèdent une région de 150 acides aminés hautement conservée, la comparaison des séquences protéiques de p35 et p39 avec celles des cyclines ne montre pas d'homologies. Néanmoins, ces petites molécules adoptent une structure tridimensionnelle similaire au domaine globulaire des Cyclines, permettant l'interaction avec les Cdks (Tang et al., 1997). Chez la souris, le double

KO p39/p35 est embryonnaire létal et présente un phénotype très similaire à celui des souris $Cdk5^{-/-}$, en revanche, la déplétion d'un des deux activateurs est viable, suggérant un phénomène de compensation, avec un phénotype plus marqué dans les $p35^{-/-}$, qui indique une spécificité physiologique de ces deux activateurs (Chae et al., 1997; Ko et al., 2001). L'expression des protéines p39 et p35 est ubiquitaire mais elles sont majoritairement exprimées au niveau des cellules post-mitotiques du système nerveux central, et avec une localisation cellulaire différente au cours du développement de l'animal. (Zheng et al., 1998).

3.2.2 La protéine p25

Il a été montré que la forme majoritaire activatrice de Cdk5 dans le cerveau était p35. La Calpaïne (Calcium activated protéase) clive la protéine p35 du côté N-terminal en deux protéines : p10 et p25, cette dégradation est induite par diverses conditions neurotoxiques telles que le stress oxydatif, l'ischémie, l'exposition au peptide β -Amyloïde ou encore l'augmentation de la concentration du calcium (Lee et al., 2000). L'observation que la forme la plus abondante après purification des complexes Cdk5/activateurs à partir de lysats cellulaires est une association de Cdk5 à p25 est probablement due au clivage de p35 en cours de purification qui peut entraîner des clivages *in vitro* (Kusakawa et al., 2000). Cette dégradation n'augmente pas l'activité kinase de Cdk5, mais augmente la stabilité du complexe puisque le temps de demi-vie de l'activateur p25 est trois fois plus élevé que celui de p35 qui n'est que de 20 à 30 minutes (Tarricone et al., 2001). Ainsi le clivage de la protéine p35 en p25 probablement favorise l'activité de Cdk5 dans des conditions de stress cellulaire.

Cette forme stable se relocalise anormalement dans le cytoplasme, et induit des phosphorylations associées à de l'apoptose dans les neurones. L'accumulation de la forme tronquée p25 est également associée à des dégénérescences anormales telles que celles caractérisant la maladie d'Alzheimer (Kusakawa et al., 2000). La protéine p29 est un autre activateur retrouvé dans les neurones, c'est un produit de clivage de p39 qui engendre également des dérégulations de l'activation de Cdk5 (Patzke and Tsai, 2002).

3.2.3 Autres partenaires de Cdk5

D'autres partenaires de Cdk5 ont été décrits dans la littérature (**Figure 21**), notamment la Cycline I. Cette cycline est exprimée de façon constitutive dans les cellules, avec un niveau d'expression plus élevé dans le cerveau, le cœur, le foie et les cellules musculaires (Nakamura et al., 1995). Il a été montré que la Cycline I active Cdk5 dans des cellules différenciées telles que les neurones et les podocytes et que cette activation permet de cibler des substrats

distincts de ceux ciblés par le complexe Cdk5/p35. Deux voies parallèles dépendantes de l'activité de Cdk5 permettant de limiter la mort cellulaire par apoptose sont ainsi activées dans ces cellules : le complexe Cycline I/Cdk5 active la voie MEK1/2-ERK1/2 et le complexe p35/Cdk5 phosphoryle directement Bcl-2, ces deux complexes promouvant la survie cellulaire dans les cellules différenciées (Brinkkoetter et al., 2009; Brinkkoetter et al., 2010; Taniguchi et al., 2012).

Une interaction de Cdk5 avec la Cycline D a également été démontrée, en revanche aucune preuve d'activation de Cdk5 par la cycline D n'a été faite (Guidato et al., 1998). D'autres résultats suggèrent plutôt un rôle de la Cycline D dans la régulation du complexe Cdk5/p35 dans les neurones (Modi et al., 2012). Cdk5 interagit également avec la Cycline E, contrairement à son rôle activateur sur les Cdks du cycle cellulaire, dans les neurones, la Cycline E forme un complexe inactif avec la kinase Cdk5 et cette séquestration ne permet pas son interaction avec p35 et p39. Cette interaction aurait un rôle physiologique puisqu'elle promeut la croissance dendritique, la plasticité synaptique et la mémoire dans les neurones (Odajima et al., 2011).

3.2.4 Régulation de l'activation de Cdk5

Les analyses du complexe Cdk5/p25 par cristallographie montrent que la forme active de Cdk5 présente une structure tridimensionnelle très similaire à celle de Cdk2 observée dans le complexe CyclineA/Cdk2. Cette activation ne passe pas par la phosphorylation CAK dépendante de Cdk5 sur le site Thr160, même si celui-ci est conservé. De ce fait, l'ouverture de la boucle T ne serait pas stabilisée par la phosphorylation du site Thr160, mais plutôt par la spécificité de l'interaction Cdk5/p35 ou p25. Cette spécificité serait associée à la phosphorylation d'un site à proximité de la Thr160, la Ser159, qui aurait un rôle direct dans la reconnaissance de Cdk5 par ses activateurs (Tarricone et al., 2001). Toutefois, cette hypothèse est largement controversée puisque certains travaux montrent que cette phosphorylation n'est pas nécessaire à l'activation de Cdk5 (Poon et al., 1997; Qi et al., 1995). D'autres suggèrent que cette phosphorylation régule négativement l'activité de Cdk5 (Tarricone et al., 2001) et d'autres encore proposent un effet activateur (Rosales et al., 2003). Une autre particularité du complexe Cdk5/p35 réside dans le fait que p35 peut directement interagir avec les substrats de Cdk5 par une association aux résidus basiques à proximité du motif (S/TP) spécifique des Cdks. Par conséquent, Cdk5 a la particularité de phosphoryler les motifs Serine-Proline ou Thréonine-Proline de préférence à proximité de résidus basiques tel que l'arginine et la lysine. Cdk5 phosphoryle ainsi les séquences de type (S/T)PX(K/H/R) (Lalioi et al., 2010).

3.2.4.1 Régulation post traductionnelles de Cdk5 et p35

L'inhibition de l'activité kinase des Cdks passe par la phosphorylation de deux sites situés dans la poche permettant l'association à l'ATP sur les résidus Thr14 et Tyr15. Dans le cas de Cdk5, les résultats sont assez contradictoires, il avait été rapporté que Cdk5, contrairement aux autres Cdks, serait activée par la phosphorylation de la Tyr15 (Lalioi et al., 2010). Mais de récents travaux suggèrent que cette phosphorylation n'impacterait pas sur l'activation de Cdk5 (Kobayashi et al., 2014). De plus les kinases Wee1 et Myt connues pour phosphoryler les Cdks sur ces deux sites, ne phosphorylent pas Cdk5 (Lalioi et al., 2010).

Un des facteurs majeurs qui permet la régulation de l'activité de Cdk5 dans les neurones est la dégradation de p35 et p39. Cette dégradation passe par la phosphorylation des activateurs qui permet leur redirection vers le protéasome. Lorsque Cdk5 est activée, elle phosphoryle p35 sur deux sites : la Ser8 et la Thr138, la phosphorylation sur le site Ser8 est constante au cours du développement, alors que la phosphorylation sur le site Thr138 n'est observée qu'au stade fœtal. Cette réduction de la phosphorylation du site Thr138 serait due à une augmentation de la déphosphorylation dépendante de la phosphatase PP2A. La phosphorylation sur le site Thr138 joue plusieurs rôles : elle prévient le clivage de la molécule p35 en p25 et par conséquent les dérégulations de l'activation de Cdk5 et elle permet la redirection de p35 vers le protéasome, régulant de ce fait l'activation du complexe.

3.3 Rôles de Cdk5

3.3.1 Rôle pro et anti-apoptotique dans les neurones

Cdk5 possède un rôle neuroprotecteur majeur puisqu'elle est requise pour la survie des neurones. Il a été montré que l'absence de Cdk5 sensibilise les cellules neuronales aux UV car Cdk5 a un rôle anti-apoptotique *via* la régulation négative de la voie c-Jun après irradiation UV (Li et al., 2002) et que la suppression de Cdk5, par un effet dominant négatif, sensibilise les neurones aux dommages induits par la CPT (Camptothécine) (O'Hare et al., 2005). Une sensibilité aux UV a également été observée dans d'autres cellules différenciées telles que les podocytes en absence de Cdk5. Dans ces cellules, il a en effet été montré que l'activation de Cdk5 par p35 et la Cycline I avait un effet positif sur la survie cellulaire (Brinkkoetter et al., 2009). De plus, Cdk5 est impliquée dans l'activation de la voie anti-apoptotique PI3K/AKT dans les neurones (Li et al., 2003).

Paradoxalement, Cdk5 dans certaines circonstances peut être pro-apoptotique. Cette situation est souvent associée au clivage de l'activateur p35 et à la nucléarisation du complexe

Cdk5/p25. De ce fait, p35 est associée à la survie cellulaire et p25 à l'apoptose. Dans les neurones, il a été montré que Cdk5 phosphorylait ATM sur la serine 794 et que cette modification était nécessaire pour l'activation d'ATM. En effet, elle facilite la phosphorylation du site Ser1981 après traitement à la CPT, ce qui permet la réactivation du cycle cellulaire nécessaire à l'induction de l'apoptose (Tian et al., 2009). Une autre protéine de la réparation est également phosphorylée dans les neurones, il s'agit de l'endonucléase Ape1. Le traitement de cellules neuronales avec du MPP (1-méthyl-4-phényl pyridinium) entraîne la phosphorylation d'Ape1 par Cdk5 sur le site Thr232. Cette phosphorylation réduit l'activité endonucléase d'Ape1, entraînant l'accumulation de sites AP dans la cellule et induisant la mort cellulaire (Huang et al., 2010). Une autre étude suggère que la phosphorylation d'Ape1 par Cdk5 sur la Thr233 augmente l'ubiquitination de la protéine dans différents types cellulaires (Busso et al., 2011). Dans ce sens il a également été montré que les irradiations de cellules neuronales aux rayons X stimulent l'expression du complexe Cdk5/p25 et augmente l'apoptose (Sun et al., 2013). La dérégulation de l'activité de Cdk5 est associée dans les neurones à la réactivation du cycle cellulaire, elle passe notamment par la phosphorylation de la protéine du Rétinoblastome (pRb). Il a en effet été montré dans des neurones de souris que la kinase Cdk5 phosphoryle la protéine pRb sur plusieurs sites et que Cdk5/p25 stimule l'activité du complexe E2F. Dans des conditions normales, la phosphorylation de pRb dans le cytoplasme ne suffit pas à activer le facteur de transcription E2F, en revanche en condition de stress, le clivage de p35 en p25 permet l'hyperphosphorylation de la protéine pRb et par conséquent l'activation d'E2F (Futatsugi et al., 2012; Hamdane et al., 2005).

De plus, le complexe Cdk5/p35 est activé par la voie ERK en réponse aux dommages causés par la mitomycine C dans les neurones, cette activation aurait un rôle sur la phosphorylation et la stabilisation de la protéine Rb et l'induction d'apoptose (Lee and Kim, 2007). L'implication de la protéine Cdk5 dans l'apoptose des neurones est en partie associée à sa capacité d'interagir avec l'histone déacétylase-1 (HDAC) qui a pour rôle de compacter l'ADN et de réprimer les gènes impliqués dans le cycle cellulaire tels que E2F et les Cyclines A et E, l'interaction de Cdk5/p25 avec l'HDAC entraîne une surexpression des gènes du cycle cellulaire, et par conséquent une accumulation de dommages induisant l'apoptose (Kim et al., 2008).

3.3.2 Conséquences pathologiques du dérèglement de l'activité Cdk5 dans les neurones

L'activation anormale du complexe Cdk5/p25 réactivant le cycle cellulaire, les dérégulations de l'expression de Cdk5 sont associées à plusieurs pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Ahn et al., 2008; Hernandez-Ortega et al., 2007). Cette réactivation passe par la phosphorylation de la protéine pRb, qui dans ces conditions peut induire de façon anormale la réplication des neurones, ces cellules dégèrent alors par apoptose avant la mitose (Lopes and Agostinho, 2011). De plus, une activité Cdk5 anormalement élevée a été observée chez les patients atteints d'Alzheimer. Elle conduit à 1) une phosphorylation excessive de la protéine précurseur du peptide amyloïde, générant la formation d'agrégats de peptide amyloïde caractéristiques d'Alzheimer, et 2) une hyperphosphorylation de la protéine Tau, une protéine de la famille des MAPs (Microtubule Associated Protein), nécessaire pour le guidage axonal et la stabilité du cytosquelette. Tau hyperphosphorylée ne pouvant plus s'associer aux microtubules s'agrège, ces observations sont associées à la perte de mémoire et aux changements de comportements se produisant chez les patients atteints de la maladie d'alzeihmer (Lopes and Agostinho, 2011).

3.3.3 Rôles de Cdk5 dans les cellules non neuronales

L'émergence d'un rôle extraneuronal de Cdk5 vient de l'observation que le complexe Cdk5/activateur est fonctionnel dans plusieurs types de cellules non-neuronales, notamment dans les cellules pancréatiques, les monocytes, les leucocytes et myocytes, les cellules épithéliales et endothéliales, les adipocytes ou encore les ovaires de souris, et probablement d'autres types cellulaires où son activité n'a pas encore été investiguée (Arif, 2012; Contreras-Vallejos et al., 2012; Rosales and Lee, 2006). Tout comme dans les neurones, Cdk5 a été impliquée dans l'apoptose dans d'autres types cellulaires où ce processus de mort cellulaire joue un rôle dans la différenciation qui permet le remodelage des tissus. Parmi les activités extraneuronales de Cdk5, on peut citer son rôle dans l'angiogenèse, l'adhésion, la migration et la régénération cellulaire, la transcription, la sénescence, la différenciation cellulaire (Arif, 2012) et, plus récemment, dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et la réponse aux dommages (Courapied et al., 2010; Turner et al., 2008).

Lors de notre étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de Cdk5 dans la prolifération cellulaire et dans la réponse aux dommages induits par un stress réplcatif et des radiations ionisantes, des processus dont le contrôle est essentiel pour éviter le développement de cancers.

Le rôle de Cdk5 dans les cellules non neuronales en réponse aux dommages n'a été étudié que très récemment, l'un des travaux majeurs ayant permis l'identification d'un rôle de Cdk5 en réponse aux dommages est celui de Turner *et al.* (Turner et al., 2008) qui montre que la déplétion de Cdk5 par siARN sensibilise des cellules cancéreuses humaines aux inhibiteurs de PARP, au Cisplatine et à la CPT. L'inhibition de Cdk5 dans la lignée du sein CAL51 a également été associée à une accumulation de dommages spontanés (mesurés par la quantification des foyers γ H2AX) et post-irradiation (foyers Rad51), mais aucun rôle dans la signalisation et la réparation des cassures double brin n'a été identifiée après exposition aux rayons. En revanche, la mesure post irradiation de la synthèse d'ADN (RDS) a mis en évidence un défaut du point de contrôle de la phase S en absence de Cdk5, et la mesure du ratio mitotique a permis l'identification d'un défaut de l'arrêt en G2/M. En réponse aux inhibiteurs de topoisomérases, Courapied *et al.* ont observé une augmentation de l'activité kinase de Cdk5 dans des cellules de colon (HT29) et ils ont identifié le facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and Activator of Transcription 3) comme étant une des cibles de Cdk5 post traitement avec un inhibiteur de topoisomérase. Cdk5 phosphoryle STAT3 sur la serine 727, cette phosphorylation étant associée avec une augmentation de la transcription de la protéine Emel, impliquée dans la réparation des dommages à la fourche. De plus, ces travaux suggèrent que la phosphorylation sur le site 727 serait associée à une activation du point de contrôle G2/M en réduisant la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 705 et de ce fait la transcription des gènes myc et Cycline D1 impliqués dans la progression en G2/M (Courapied et al., 2010). Les récents travaux de Hsu *et al.* ont également montré une phosphorylation de STAT3 Cdk5 dépendante sur la sérine 727 en absence de dommages dans des xénogreffes de souris et des cellules issues de cancer de la prostate. Ces résultats suggèrent que Cdk5 promeut par cette phosphorylation une interaction entre STAT3 et les récepteurs aux androgènes, augmentant la prolifération cellulaire (Hsu et al., 2013).

L'U612 s'intéresse au rôle de Cdk5 en réponse aux dommages depuis quelques années, notamment par l'étude du rôle de la kinase dans la régulation de l'activité de la PARP-1 et dans la réparation de l'ADN. Les travaux menés par Bolin *et al.* (Bolin et al., 2012) ont montré que dans des cellules HeLa, l'activité de la PARP-1 est régulée par une phosphorylation inhibitrice Cdk5 dépendante, confirmant les travaux de Gagné *et al.* qui avaient montré que *in vitro* Cdk5 phosphoryle PARP-1 sur l'une des trois sérines 782, 785 et 786 (Gagné et al., 2009). De plus, la mutation de ces trois sérines réduit le recrutement de PARP-1 aux sites de dommages induits par micro-irradiation laser (Bolin et al., 2012). La même observation a été faite dans des lignées cellulaires déplétées pour Cdk5 et ce défaut

entraîne également une réduction du recrutement de XRCC1. En revanche, la cinétique de religation des cassures simple brin est similaire dans les lignées Cdk5 déplétées et les lignées Contrôles. Ces résultats suggèrent que les dérégulations de l'activité PARP et de la réparation des cassures simple brin par la sous voie du BER dite « short patch » seraient compensées par une augmentation du recrutement de PCNA dans les cellules Cdk5 KD et une augmentation de la réparation par la sous voie dite « Long Patch ».

Chapitre 3 : Cdk5 et cancer

La forte implication de Cdk5 dans le développement neuronal et la neurodégénération en fait une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de nombreuses maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Le cancer constitue un autre type de pathologie pour lequel une modification de l'expression ou de l'activité de Cdk5 pourrait constituer une approche thérapeutique. Des associations entre l'expression de Cdk5 et la progression de certains cancers ont déjà pu être établies mais une meilleure compréhension du rôle de Cdk5 dans la réponse aux dommages est nécessaire. Nous développerons dans cette dernière partie de l'introduction les travaux récents sur ce sujet et discuterons les éventuels liens entre réponse aux dommages et progression tumorale.

1. Les évènements cellulaires impliqués dans le développement tumoral

Le développement de cancers passe par l'accumulation de multiples mutations oncogéniques qui confèrent aux cellules un phénotype malin caractéristique, qui leur permettent par exemple d'échapper à l'apoptose, aux points de contrôles du cycle cellulaire, d'avoir un potentiel réplicatif augmenté, de surexprimer certains facteurs de croissance et par conséquent de devenir incontrôlables. En 2000, Hanahan et Weinberg expliquent que le développement d'un cancer dépend de six capacités biologiques distinctives : la capacité à éviter l'apoptose, la possibilité de se diviser de manière indéfinie, la capacité de développer des métastases, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, la capacité à induire de l'angiogenèse et l'autosuffisance en signaux de croissance (Hanahan and Weinberg, 2000). Onze années plus tard, un deuxième article de ces auteurs permet d'ajouter deux nouveaux paramètres à cette liste : la capacité à éviter la destruction par le système immunitaire et la dérégulation du métabolisme énergétique des cellules (Hanahan and Weinberg, 2011). Ils mettent aussi en évidence deux caractéristiques favorisant les cancers (mais qui ne sont pas qualifiées de capacités distinctives), il s'agit de l'inflammation, favorisant les tumeurs, ainsi que l'instabilité et les mutations du génome. Bien que l'on sache maintenant que cette description n'était pas complète et qu'une approche par la Biologie des Systèmes est nécessaire pour rendre compte de la complexité de ces questions, ces revues restent des références.

La compréhension des facteurs conférant ces capacités aux cellules cancéreuses est un élément important pour la détermination de nouveaux facteurs de pronostic et le

développement de traitements antitumoraux qui se basent sur l'inhibition de ces capacités dites « tumorales ». Les gènes appelés oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur ont été identifiés d'après leurs fonctions biologiques. Ces gènes font partie de ceux qui facilitent la transmission des signaux de contrôle de croissance depuis la membrane cellulaire au noyau (transduction du signal), qui induisent la division cellulaire, la différenciation ou la mort cellulaire et, peut-être le point le plus critique de tous, qui maintiennent l'intégrité des informations génétiques grâce à la réparation de l'ADN et autres processus similaires. Les modifications de la structure de ces gènes et de leur expression qui entraînent la cancérogenèse sont progressivement identifiées. Cdk5 fait partie de ces gènes.

2. Impact des variations de l'expression de Cdk5 sur le développement tumoral :

Les travaux réalisés sur des cellules tumorales non neuronales s'accordent tous sur le fait que le développement des tumeurs est souvent associé à une augmentation de l'expression et de l'activité de Cdk5 et mettent en évidence l'implication de Cdk5 dans la croissance cellulaire, la migration et le profil métastatique, suggérant que Cdk5 serait un marqueur de pronostic très prometteur. Ces cinq dernières années le nombre de publications faisant le lien entre la kinase Cdk5 et le cancer n'a cessé de s'accroître, ci-dessous nous décrivons les travaux récents sur ce sujet.

2.1 Dans le cancer du pancréas :

L'analyse de l'expression du gène *CDK5* et de ces activateurs dans des cellules d'adénocarcinome pancréatique montre qu'une surexpression des complexes Cdk5/activateurs qui est associée à l'amplification d'un des gènes *CDK5*, *p39* ou *p35* est observée dans 67% des cas analysés. De plus, Cdk5 est hyperactive dans les tumeurs porteuses de mutations dans K-Ras, une mutation souvent associée au développement de l'adénocarcinome pancréatique, l'augmentation de l'activité kinase Cdk5 a pour conséquence un effet migratoire plus élevé des cellules (Eggers et al., 2011).

2.2 Dans le cancer de la prostate :

Une activité de Cdk5 a également été observée dans des tumeurs prostatiques, le potentiel migratoire des xénogreffes de tumeurs de prostate est fortement réduit lorsqu'un dominant négatif *Cdk5dn* y est transfecté, suggérant un rôle de Cdk5 dans la progression des tumeurs invasives (Strock et al., 2006). L'étude d'une cohorte de 110 patients atteints de cancer de la prostate a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre l'activation de Cdk5 et la phosphorylation de STAT3 dans ces tumeurs. Il a été montré que la phosphorylation de

STAT3 par Cdk5 sur sa serine 727 active ce facteur de transcription, augmentant ainsi l'expression de ses cibles telles que *junB* qui agissent sur la prolifération dans les tumeurs surexprimant Cdk5 ou p35. Réciproquement, un traitement avec un inhibiteur de Cdk5 inhibe la prolifération stimulée par STAT3 (Hsu et al., 2013). Les travaux précédents de cette équipe avaient montré que Cdk5 stabilisait le récepteur aux androgènes (AR) *via* sa phosphorylation sur la Ser81 dans des cellules issues de tumeurs de prostate (Hsu et al., 2011), on sait maintenant que l'activation de ce récepteur par son interaction avec STAT3 est stimulée par la phosphorylation de STAT3 sur la serine 727, induisant la prolifération tumorale. Une étude très récente a mis en évidence un des mécanismes potentiels par lesquels l'activation de Cdk5 augmenterait le profil métastatique des tumeurs de la prostate. Jin *et al.* indiquent que l'activité kinase de Cdk5 est augmentée dans les lignées métastatiques en comparaison avec des lignées issues de cancers non métastatiques et expliquent que Cdk5 phosphoryle et active la protéine Talin. Cette activation permet l'interaction de la Talin avec la protéine transmembranaire β -intégrine et de ce fait l'augmentation de la signalisation intégrine qui promeut l'adhésion et la mobilité cellulaire et par conséquent les métastases (Jin et al., 2014).

3.3.4 Dans le cancer de la thyroïde :

La phosphorylation Cdk5 dépendante de STAT3 sur la Ser727 a également été retrouvée dans les cellules de carcinome médullaire de la thyroïde (MTC), elle augmente la prolifération cellulaire et l'activité kinase Cdk5 y est stimulée par l'accumulation d'hormone calcitonine sécrétée par les cellules C de la thyroïde (Lin et al., 2007). A la différence de la protéine p35, p25 ne semble pas jouer un rôle dans cette phosphorylation. Dans le même modèle, Pozo *et al.* ont également montré un rôle de Cdk5 dans la tumorigénèse et la prolifération tumorale, s'accompagnant d'une surexpression de p25 et une action de Cdk5 par l'intermédiaire de la protéine Rb qu'elle phosphoryle sur ses sérines 807 et 811 (Pozo et al., 2013).

3.3.5 Dans le cancer du poumon :

Liu *et al.* ont analysé l'expression de Cdk5/p35 dans 95 échantillons de cancers de poumon de type carcinome non à petites cellules (NSCLC), l'immunohistochimie montre une expression de Cdk5/p35 dans plus de 69,5% des cas, et le plus souvent, dans les cas les plus malins. L'estimation de la survie par la courbe Kaplan-Meier suggère un meilleur pronostic pour les patients n'exprimant pas Cdk5/p35 (Liu et al., 2011). Dans une autre étude, il a été montré une expression de Cdk5 et p35 dans des cancers primaires du poumon et dans de nombreuses lignées tumorales de poumon où elle est associée à la migration et à l'invasion cellulaire, l'inhibition de Cdk5 conduisant à une diminution de la migration des cellules tumorales. Dans

ce modèle, l'expression de Cdk5 est modulée par le facteur de transcription hASH1 (Achaete-Scute Homologue-1) (Demelash et al., 2012).

3.3.6 Dans le cancer du sein :

L'expression de Cdk5 et son activité se sont également avérées être augmentées dans les cellules issues de cancer du sein. Cette surexpression est associée aux tumeurs dont le pronostic est mauvais, notamment celles négatives pour les récepteurs aux œstrogènes (ER-), et les tumeurs malignes de grade III (Liang et al., 2013). D'un point de vue moléculaire, Liang *et al.* expliquent que Cdk5 agit en aval de la signalisation TGF- β via la phosphorylation de la protéine FAK (Focal Adhésion Kinase), qui augmente l'adhésion cellulaire et la mobilité (Liang et al., 2013). De plus, l'activation de FAK stimule les transitions épithélio-mésenchymateuses qui entraînent la formation de métastases (Larue and Bellacosa, 2005). Enfin, une récente étude protéomique a identifié deux protéines formant un complexe *in vivo* avec Cdk5 : KIA A0528 et FIB qui sont fortement exprimées dans les lignées de sein et dont l'inhibition réduit la prolifération cellulaire, mais le rôle de ces protéines n'est pas encore bien caractérisé (Xu et al., 2014).

En conclusion, les facteurs par lesquels les cellules cancéreuses surexpriment Cdk5 restent pour le moment mal connus mais un certain nombre d'études mettent en évidence l'importance de la régulation de la kinase dans les cellules non neuronales, et l'impact de sa surexpression dans les processus prolifératifs et migratoires. L'implication de Cdk5 dans le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN est un paramètre nouveau qu'il faut également mieux comprendre pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans un contexte Cdk5 surexprimé.

3.4 Le développement d'inhibiteurs de Cdks :

Les kinases jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus cellulaires, notamment dans la prolifération, la progression dans le cycle cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose, une dérégulation de leur activité peut donc entraîner des modifications majeures de ces processus, c'est notamment le cas pour les kinases dépendantes des cyclines qui sont primordiales pour la survie des cellules cancéreuses et impliquées dans l'oncogénèse. De plus, la phosphorylation de certaines protéines cibles des Cdks (telles que pRb, p21, Akt, p27, EGFR, ERK) est associée au pronostic des cancers.

La plupart des Cdks ont été impliquées dans le développement tumoral, : Cdk1 s'avère être un marqueur de diagnostic pour les cancers du sein et de l'œsophage, Cdk2 a été associée au pronostic des cancers du sein, de l'ovaire et de la bouche, Cdk4 est impliquée dans le

cancer de l'ovaire, de la prostate, de l'endomètre et de la bouche, l'expression de Cdk6 est altérée dans le cancer de la bouche et certains polymorphismes du gène *CDK7* ont été associés au cancer du sein (revue dans (Cicenas and Valius, 2011)). Ces fréquentes dérégulations des Cdks au cours de la progression tumorale peuvent être la conséquence de diverses altérations génétiques, telles que la mutation ou le silencing des inhibiteurs cellulaires des Cdks (les protéines INK et les kinases CIP/KIP), ou la mutation de la protéine du rétinoblastome Rb qui augmente l'activité kinase des Cdks.

Le développement d'inhibiteurs de Cdks semble par conséquent être une possible voie de traitement. En effet, l'inhibition des Cdks est antiproliférative (bloquant les cellules en G1 ou G2/M), et elle induit l'apoptose (Knockaert et al., 2002). Après 20 ans de recherche, il existe de nombreuses molécules disponibles mais pour le moment aucune n'est sur le marché dans le cadre de la thérapie anti-cancéreuse. Ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques d'une Cdk particulière. Cela peut présenter un avantage dans la mesure où la progression tumorale s'accompagnant souvent de plusieurs dérèglements, cibler plusieurs Cdks en même temps peut permettre de bloquer le processus de progression cellulaire à des doses pharmacologiques plus faibles afin de réduire l'effet cytotoxique du médicament.

Plusieurs groupes d'inhibiteurs existent, ils peuvent être regroupés en fonction de leurs cibles : les inhibiteurs ciblant toutes les Cdks (flavopiridoles, oxindole16...), les inhibiteurs ciblant préférentiellement Cdk1, Cdk2, Cdk5 (roscovitine, purvalanol, SU 9516...) et les inhibiteurs ciblant Cdk4 et Cdk6 (fascaplysin, PD0183812, CINK4...) (Knockaert et al., 2002). On peut également les regrouper en fonction de leur mode d'action : ATP compétitifs c'est à dire qui s'intègrent au niveau de la poche d'ATP, et ATP non compétitifs qui, se fixent sur une autre région de la kinase. Certaines molécules de cette deuxième catégorie ont été mises au point à partir des inhibiteurs de kinases p21 et p27 (Mariaule and Belmont, 2014), ils constituent pour le moment très peu de molécules et ne sont pas encore au stade des essais cliniques.

3.4.1 Les inhibiteurs en essais cliniques :

Les inhibiteurs actuellement en phase d'essai clinique sont des inhibiteurs ATP compétitifs ciblant plusieurs Cdks. Ceux ayant été décrits comme visant Cdk5 sont détaillés ci-dessous.

3.4.1.1 La roscovitine:

Cet inhibiteur également appelé Seliciclib ou CYC202, a été découvert à Roscoff (France) par Laurent Meijer et est rentré en essai clinique en 2001, il est actuellement développé par Cyclacel pharmaceutic. Il cible plusieurs Cdks avec des IC_{50} (concentration inhibitrice

médiane qui correspond à la quantité d'inhibiteur nécessaire pour la réduction de l'activité kinase de 50%) différentes : Cdk1 ($IC_{50} = 0.65\mu M$), Cdk2 ($IC_{50} = 0.7\mu M$), Cdk5 ($IC_{50} = 0.16\mu M$), Cdk7 ($IC_{50} = 0.5\mu M$) et Cdk9 ($IC_{50} = 0.6\mu M$), ces valeurs étant variables d'une étude à l'autre (Ribas et al., 2006). Cet inhibiteur est largement utilisé en recherche et souvent décrit comme inhibant Cdk5. Au niveau cellulaire, la roscovitine entraîne des dérèglements du cycle cellulaire et une réduction de la prolifération cellulaire, une inhibition de la synthèse d'ARN Cdk7 et 9 dépendante et une accumulation des protéines pro-apoptotiques p53 et Bcl-x et de l'apoptose (Ljungman and Paulsen, 2001; Mihara et al., 2002; Ribas et al., 2006). La roscovitine est actuellement en phase II d'essais cliniques, elle est testée dans le traitement du cancer du poumon (NCLS). Elle a également été administrée en association avec la gemcitabine/cisplatine ou avec le docetaxel, elle présente une bonne biodisponibilité. Chez 52 patients atteints de NSCLC, 9 traités avec roscovitine et gemcitabine/cisplatine présentent une réponse partielle, et 21 une stabilisation de leur état ; parmi ceux traités avec roscovitine et docetaxel, 2 ont partiellement répondu et un patient a été stabilisé (Mariaule and Belmont, 2014), plusieurs effets secondaires ont toutefois été rapportés, notamment des nausées, anorexies, vomissements, anomalies du foie (Cicenas and Valius, 2011; Le Tourneau et al., 2010).

3.4.1.2 Le Dinaciclib (SCH727665)

En essais cliniques chez Merck, cet inhibiteur cible Cdk1, Cdk2, Cdk5 et Cdk9. Douze et 14 fois plus spécifique pour Cdk2 et Cdk5 respectivement que pour Cdk1 avec une IC_{50} de l'ordre de 1 nM, cette molécule inhibe la synthèse d'ADN, réduit la phosphorylation de la protéine Rb et stimule l'apoptose. Les essais sur xénogreffes de souris montrent un effet antiprolifératif (Parry et al., 2010). Cet inhibiteur est en essai clinique de phase III chez des patients atteints de leucémies, il serait moins toxique que d'autres inhibiteurs sur le marché du fait de sa spécificité pour les kinases de type Cdk (Mariaule and Belmont, 2014).

3.4.1.3 AT7519:

Cet inhibiteur est en essais cliniques chez Astex Pharmaceutical, il agit sur plusieurs Cdk, induisant des dérégulations du cycle cellulaire et une inhibition de l'ARN polymérase II. Les valeurs des IC_{50} sont de l'ordre de 190 nM pour Cdk1, 44 nM pour Cdk2, 67 nM pour Cdk4, 18 nM pour Cdk5 et < 10 nM pour Cdk9. Au cours de la phase I d'essais cliniques, 28 patients ont été traités, un est décédé et un a développé de l'hypotension artérielle. La phase II est en cours pour le traitement des lymphomes du manteau et des leucémies lymphoïdes chroniques (Mariaule and Belmont, 2014).

3.4.1.4 PHA-848125:

Egalement appelé milciclib, il cible Cdk1 (IC₅₀: 2 nM), Cdk2 (IC₅₀: 3 nM), Cdk4 (IC₅₀: 5 nM) et Cdk5 (IC₅₀: 4 nM). Deux études sont actuellement en essais cliniques de phase II et les premiers résultats présentés au rapport annuel de l'ASCO 2014 montrent que sur 30 patients atteints d'un carcinome thymique traités au milciclib étudiés, 14 sont en rémission (survie moyenne sans récurrence de 3 mois) et la toxicité semble modérée (Mariaule and Belmont, 2014).

L'identification d'un inhibiteur spécifique de Cdk5 est d'autant plus prometteuse que l'hyperactivation de cette Cdk est impliquée dans plusieurs pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. L'élaboration d'inhibiteurs spécifiques se heurte toutefois à une difficulté majeure : la grande homologie de structure entre les différentes Cdk. Cdk2 et Cdk5, par exemple, présentent 60% d'homologie avec une séquence similaire à 93% (27/29 résidus) au niveau de la poche d'interaction avec l'ATP. Pour le moment un seul inhibiteur spécifique de Cdk5 est en cours de développement, il fait partie de la classe des 4-Aminoimidazol.

3.4.1.5 Les 4-Aminoimidazol : vers un inhibiteur spécifique de Cdk5 ?

Récemment un inhibiteur 30 fois plus sélectif pour le complexe Cdk5/p25 que pour Cdk2/CyclinA ou E a été proposé. Afin d'aboutir à cette spécificité pour Cdk5, les chercheurs ont modélisé cette molécule de sorte que l'interaction se situe principalement au niveau des deux résidus présentant des différences au niveau de la poche d'ATP, à savoir Cys83 et Asp84 pour Cdk5 et Leu83 et His84 pour Cdk2, c'est ainsi que le groupe des 4-Aminoimidazol a été synthétisé (Helal et al., 2009). Ils interagissent spécifiquement avec la Cys83 de Cdk5 et les analyses structurales de Rath *et al.* montrent que l'aminimidazol *N*-(1-[*cis*-3-(acetylaminocyclobutyl)-1H-imidazol-4-yl]-2-(4-methoxyphenyl)acetamide) s'intègre plus profondément dans la poche du substrat de Cdk5 en comparaison avec Cdk2. Les interactions électrostatiques sont également plus fortes et la sélectivité due aux variants Cys84 et Asp84 mais aussi à la présence d'un autre variant, Asn144, permettent une conformation allostérique plus favorable à l'interaction avec d'autres résidus et des distances (inhibiteur/kinase) réduites, conférant une énergie plus forte au complexe Cdk5-inhibiteur (Rath and Senapati, 2013). Ce groupe d'inhibiteur serait d'autant plus intéressant qu'une double inhibition potentielle, ciblant aussi la protéine GSK3-β, une autre kinase impliquée dans des dérégulations neuronales, a été décrite (Helal et al., 2009). Pour le moment aucune étude clinique n'a été menée avec ce nouveau groupe d'inhibiteurs, et l'inhibiteur n'a pas

encore été commercialisé mais les valeurs des IC_{50} , qui sont de 9nM et 63nM pour Cdk5 et Cdk2 respectivement *in vitro* sont très prometteuses (Helal et al., 2009; Rath and Senapati, 2013).

3.5 La thérapie ciblée : une autre manière d'aborder le traitement

Les travaux de Turner *et al.* (Turner et al., 2008) ont démontré que l'inhibition de Cdk5 par l'utilisation de siARN sensibilise les cellules humaines CAL51 et HeLa aux inhibiteurs de PARP, cette observation a été confirmée par Bolin *et al.* (Bolin et al., 2012). Ce type d'analyses génétiques basées sur la sensibilisation des cellules par l'inhibition de deux gènes simultanément est appelé « **léthalité synthétique** ». La léthalité synthétique est définie comme une interaction génétique dans laquelle l'inhibition d'un des deux gènes est viable, mais où l'inhibition simultanée des deux gènes est létale (Ashworth et al., 2011)(Figure 23). Ce principe a permis l'identification par des cribles à large échelle d'un certain nombre de ces interactions dites létales qui peuvent ensuite être étudiées dans plusieurs modèles cellulaires afin de déterminer si elles présentent un intérêt pour les traitements anticancéreux.

En 2005, les groupes de Ashworth et Helleday (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005) ont montré dans des études *in vitro* que les cellules mutées pour *BRCA1* ou *BRCA2*, dans lesquelles la réparation des cassures double brin par RH était compromise, étaient hypersensibles à l'inhibition de l'activité PARP.

Le mécanisme ayant été proposé à la base de cette toxicité repose sur le blocage de la voie de réparation des CSB dû à l'inhibition de PARP, qui conduit à la formation de CDBs lors de la progression des fourches de réplication. Dans des cellules normales ou hétérozygotes pour *BRCA1* ou *BRCA2*, ces lésions létales peuvent être réparées par HR mais dans les cellules tumorales qui sont mutées pour les deux allèles de *BRCA1* ou *BRCA2*, ce système étant inopérant, l'inhibition de PARP conduit à la mort cellulaire. Ils ont ainsi démontré pour la première fois l'efficacité de l'utilisation potentielle des inhibiteurs de PARP comme agents thérapeutiques en monothérapie. Ce traitement est prometteur puisque d'autres mutations des voies de la recombinaison homologue souvent retrouvées dans les tumeurs peuvent être mises à profit, par exemple la perte de la protéine Rad51, la méthylation du promoteur de *BRCA1*, la mutation d'*ATM* et *ATR* sont des profils retrouvés dans 50% des cas de cancers épithéliaux de l'ovaire.

Synthetic lethality e.g. *BRCA* and *PARP*

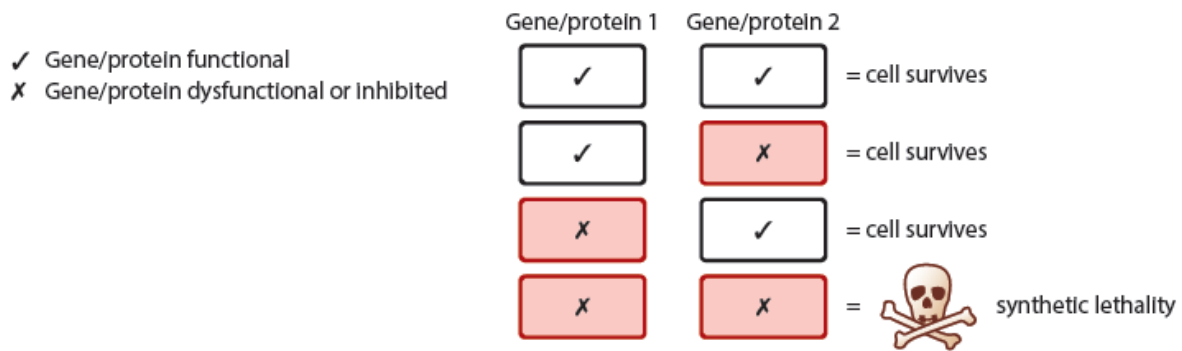


Figure 23: Principe génétique de la létalité synthétique

La létalité synthétique a lieu lorsque l'inhibition simultanée de deux gènes est létale alors que l'inhibition d'un des deux gènes seulement est viable (d'après (Lord et al., 2014)).

La compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la létalité synthétique observée dans le cadre de l'association d'inhibiteurs de PARP à une mutation *BRCA1* ou *BRCA2* a fait l'objet de débats en 2011. Helleday (Helleday, 2011) propose que la cytotoxicité des inhibiteurs de PARP ne serait pas due au rôle de PARP-1 dans la réparation des cassures simple brin par le BER mais serait plutôt associée à son implication au niveau de la fourche de réplication (**Figure 24**). En effet les inhibiteurs de PARP bloquent la PARP-1 au niveau du site de la lésion simple brin, générant un obstacle à la fourche de réplication. Dans le cas où la fourche est instable ou que les mécanismes de redémarrage HR dépendants sont déficients, l'inhibiteur de PARP est cytotoxique. L'observation d'une sensibilité augmentée dans le cas d'une inhibition chimique de PARP en comparaison avec une déplétion de la PARP dans les cellules est cohérent avec cette observation (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Le groupe de Kaufmann (Patel et al., 2011), lui, propose une invalidité du modèle basé sur l'inhibition du BER en démontrant que l'inhibition de XRCC1, qui est recruté par la PARP-1, ne suffit pas à sensibiliser les cellules *BRCA1* ou *BRCA2* mutées aux inhibiteurs de PARP (Patel et al., 2011). L'explication proposée est que cette sensibilité serait plutôt liée à une hyperactivation du NHEJ, régulé par PARP-1, qui entraîne des instabilités génomiques létales. Cette étude montre que l'utilisation d'inhibiteurs de NHEJ réduit cette cytotoxicité PARP dépendante. En conclusion il serait possible d'envisager exploiter ce modèle de létalité synthétique dans le cas des tumeurs ayant une faible expression de Cdk5, en émettant l'hypothèse que ces tumeurs répondraient de manière plus efficace à un traitement aux inhibiteurs de PARP, mais auparavant les mécanismes précis dans lesquels Cdk5 intervient dans les cellules non neuronales doivent être mieux compris.

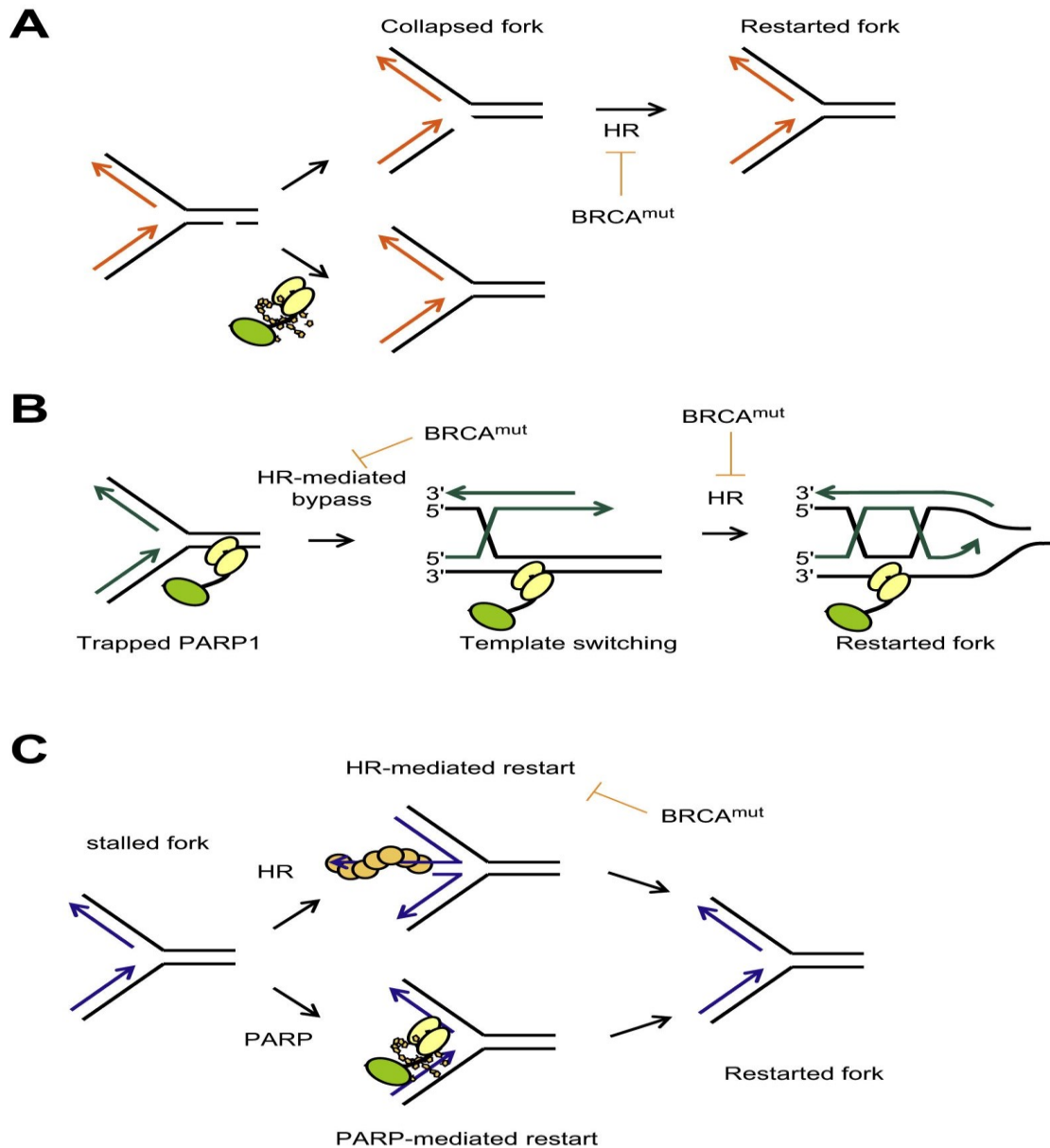


Figure 24: Différents modèles expliquant la létalité synthétique BRCA1/PARP1

(A) Accumulation de cassures simple brins à la fourche de réplication : l'inhibition de PARP1 génère une accumulation de lésions simple brin, ces dommages persistent et génèrent des CDB qui sont toxiques en absence de BRCA1. **(B) Blocage de la PARP sur la lésion** : dans ce modèle il est suggéré que les inhibiteurs de PARPs agissent en bloquant la PARP-1 sur la lésion simple brin formée, formant un obstacle à la fourche de réplication en phase S, qui requière Le HR pour réparer ce type de lésion, le HR est déficient en absence de BRCA1 est déficient. **(C) PARP-1 est requise pour le redémarrage de la fourche de réplication** : lorsqu'une fourche de réplication est bloquée, PARP-1 est requise pour le redémarrage de la fourche par un mécanisme indépendant de BRCA1, de ce fait l'inhibition de PARP1 et BRCA1 à la fourche est létal (d'après (Helleday, 2011)).

**JUSTIFICATION DES TRAVAUX DE
THESE**

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'U612 dirigée par le Dr Janet Hall, la thématique majeure de l'équipe porte sur la compréhension du rôle des poly(ADP-ribose) polymérases (PARPs) PARP-1 et PARP-2 dans la réponse et la réparation des dommages de l'ADN.

A mon arrivée au laboratoire, le travail de Céleste Bolin (Bolin et al., 2012) venait de mettre en évidence une implication de la kinase Cdk5 dans la survie aux RI, et son importance dans le recrutement des protéines de réparation PARP-1 et XRCC1 aux foyers de dommages induit par une micro-irradiation laser. L'objectif était alors de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la létalité synthétique entre la déplétion de Cdk5 et les inhibiteurs de PARP observée par Turner en 2008 (Turner et al., 2008), et confirmée par notre équipe (Bolin et al., 2012), ainsi qu'à la radiosensibilité.

Les résultats de Bolin et al. (Bolin et al., 2012) ont montré que la religation des lésions simple brin est identique dans les lignées Contrôles et les lignées déplétée de façon stable pour Cdk5 (Cdk5 KD). Bien que dans les lignées déplétées pour Cdk5, le recrutement des protéines XRCC1 et PARP-1 aux sites de dommages induit par une micro-irradiation laser (405 nm) était réduit en comparaison avec les lignées Contrôles, le recrutement de PCNA était, lui, augmenté dans les lignées Cdk5 KD. Ces données suggèrent que le défaut de réparation des lésions par la voie du « Short Patch » du BER (PARP-1 et XRCC1 dépendante) dans la lignée Cdk5 KD favoriserait la voie du « Long Patch » (PCNA dépendant) (**Figure 25**).

Dans ces travaux, Bolin *et al.* montrent également que le recrutement de la PARP-1 nécessite une régulation post traductionnelle Cdk5 dépendante. En effet Cdk5 phosphoryle PARP-1 sur trois sérines (S782, S785, S786) *in vitro*, et la surexpression d'un plasmide PARP-1 muté pour ces trois sérines (de ce fait ne pouvant pas être phosphorylé dans les lignées HeLa) entraîne une réduction du recrutement et de la persistance de la PARP-1 aux sites de dommages, phénotype similaire à celui observée dans les lignées Cdk5 KD (Bolin et al., 2012). Ce résultat est en accord avec ceux de Gagné *et al.* qui ont montré que la kinase Cdk5 pouvait phosphoryler PARP-1 *in vitro* (Gagne et al., 2009).

Basé sur l'observation qu'en l'absence de Cdk5 le niveau de polymères est augmenté, l'hypothèse émise par Bolin *et al.* est que cette augmentation de PAR génère une accumulation de charges négatives autour de PARP-1 et par conséquent réduit son recrutement et sa persistance au site de la lésion.

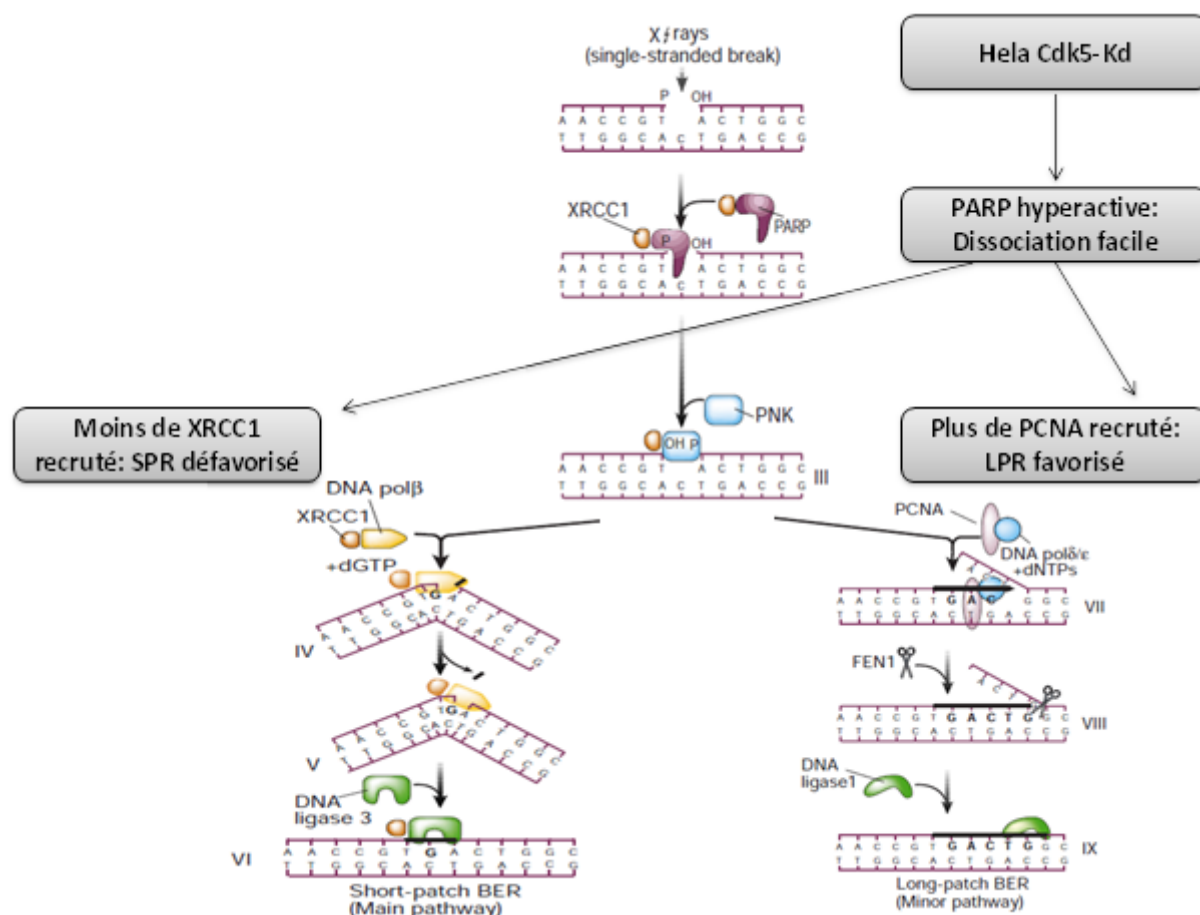


Figure 25: Les effets de la déplétion de Cdk5 sur l'activité de PARP-1 et le recrutement de PARP-1, XRCC1 et PCNA, conséquences sur le SSB.

(Modèle proposé par (BOUDRA, 2012), modifiée de(Hoeijmakers, 2001)).

Nous avons également envisagé la possibilité d'un rôle de la kinase Cdk5 dans la réparation des cassures double brin. Ce rôle pouvait expliquer l'effet sensibilisateur des inhibiteurs de PARP en absence de Cdk5 ainsi que la radiosensibilité. Nos premiers résultats ont montré que l'absence de Cdk5 ne sensibilise pas les cellules à la néocaricostatine (NCS), un agent radiomimétique inducteur de cassures double brin. Comme attendu, la lignée HeLa déplétée en DNA-PKcs (DNA-PK KD) s'est révélée extrêmement sensible à la NCS du fait du rôle de cette protéine dans la réparation des cassures double brin par suture non homologue. Cette observation écarte ainsi la possibilité que Cdk5 joue un rôle direct dans la réparation des cassures double brin générées d'emblée dans l'ADN par les RI. Turner *et al.* ont montré qu'une lignée CAL51 déplétée en Cdk5 présente une déficience des points de contrôle intra-S et G2/M en réponse aux RI. Ces expériences, effectuées par la mesure de la synthèse d'ADN (Radiation Resistant DNA Synthesis) et du ratio mitotique post-irradiation (Turner et al., 2008) suggèrent que ces défauts pourraient expliquer la sensibilité de ces

cellules au Cisplatine et à la CPT. Le traitement à la CPT occasionne des dommages spécifiques de la fourche de réplication qui requièrent l'activation du point de contrôle intra-S et l'initiation des mécanismes de réparation et de redémarrage en phase S (Pommier et al., 2003). Leur accumulation est létale pour la cellule. Les précédentes observations, associées au fait que l'inhibition de Cdk5 sensibilise également aux inhibiteurs de PARP dont la létalité a également aussi été associée avec une collision entre lésions nécessitant la PARP-1 pour leur réparation et la fourche de réplication (Helleday, 2011), suggèrent que la protéine Cdk5 pourrait contribuer à la prise en charge de ce type de lésion à la fourche de réplication.

Ma thèse avait comme objectif de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la radiosensibilité des lignées Cdk5 KD et à leur sensibilité aux inhibiteurs de PARP.

Pour cela, je me suis focalisée sur la compréhension du rôle de la protéine Cdk5 dans le contrôle du cycle cellulaire en absence de dommages et après irradiation ou traitement au HU ainsi qu'aux autres aspects de la réponse aux dommages de l'ADN que sont la signalisation et la réparation après exposition aux RI et stress réplicatif.

L'objectif était de répondre à deux questions principales :

- Par quels mécanismes Cdk5 est-elle impliquée dans le contrôle du cycle et dans quelle mesure cela influe sur la survie cellulaire ?
- Cdk5 est-elle requise spécifiquement pour la signalisation et/ou la réparation des lésions de l'ADN induites à la fourche de réplication et quelles sont ses cibles dans ce contexte ?

Ces travaux ont été réalisés avec un modèle de lignées HeLa déplétées de manière stable pour Cdk5. Deux clones ciblant des parties différentes du gène ont été étudiés et comparés à deux clones Contrôles, exprimant normalement la protéine Cdk5 (l'établissement des deux clones est détaillé dans la partie Matériel et Méthodes).

A la fin de ma thèse, nous avons également étudié les conséquences d'une inhibition de Cdk5 sur la survie aux RI en absence et en présence d'un inhibiteur de PARP dans un autre modèle cellulaire : des lignées de cancer du sein. Ce travail a fait suite à l'analyse de l'expression de Cdk5 dans une cohorte de patientes de l'Institut Curie qui a montré une corrélation entre une faible expression de Cdk5 dans la tumeur et une meilleure survie sans métastases des patientes.

RESULTATS

1. Article

Cdk5 promotes DNA replication stress checkpoint activation through RPA32 phosphorylation, and impacts on metastasis free survival in breast cancer patients

Dans cette partie, je résume les résultats majeurs obtenus au cours de ma thèse sur le rôle de la protéine Cdk5 dans la réponse à un stress réplicatif, qui ont montré notamment que Cdk5 phosphoryle la protéine RPA32, ainsi que l'impact d'une faible expression de Cdk5 sur la survie de lignées de cancer du sein et la corrélation entre l'expression de Cdk5 et le pronostic patientes. Les résultats sont résumés ci-dessous, puis présentés en anglais sous la forme d'un article actuellement en révision pour publication dans le journal Cell Cycle.

En absence de stress, la première observation que j'ai pu faire était une prolifération ralentie dans les lignées HeLa déplétées pour Cdk5 (Cdk5 KD), des analyses par cytométrie en flux (FACS) ont pu confirmer la progression ralentie de ces lignées et des expériences de peignage moléculaire montrent que les lignées Cdk5 KD ont une vitesse de réplication réduite et une densité de fourches réduite en absence de dommages par rapport aux lignées Contrôles, suggérant un rôle de Cdk5 dans la progression normale en phase S.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication de la protéine Cdk5 dans la réponse aux dommages induits au cours de la phase S. Nous avons observé une sensibilité des lignées Cdk5 KD à plusieurs agents induisant des stress réplicatif : l'hydroxyurée, le 5-fluorouracil et la 6-thioguanine. De plus, le traitement de ces lignées, synchronisées en phase S, avec des rayons gamma montre une radiosensibilité exacerbée, en comparaison avec des populations asynchrones, confortant notre l'hypothèse de travail selon laquelle Cdk5 serait essentielle pour la réparation des lésions s'accumulant à la fourche de réplication. Afin de mieux caractériser le rôle de la protéine Cdk5 au cours de la phase S, nous nous sommes focalisés sur la réponse cellulaire au stress induit par des traitements au HU, dont le mode d'action est bien décrit dans la littérature (Carr and Lambert, 2013; Lambert and Carr, 2013a; Magdalou et al., 2014).

L'utilisation de la technique de peignage moléculaire m'a permis d'analyser le comportement des lignées HeLa Contrôles et Cdk5 KD suite à un traitement de deux heures au HU (2mM).

La mesure de la vitesse de réplication et d'intensité des fourches dans les lignées HeLa Cdk5 KD vs HeLa Contrôles montre qu'en absence de Cdk5 les cellules ne ralentissent pas leur vitesse de réplication, et présentent un nombre d'évènements réplcatifs augmenté (mesurés par la densité des fourches) post traitement HU en comparaison avec les lignées Contrôles. Ces résultats suggèrent qu'en présence de dommages induits par un stress réplcatif, l'absence de Cdk5 ne permet pas aux cellules d'effectuer un arrêt en phase S. Afin de caractériser les raisons de cette déficience d'un point de vue moléculaire, j'ai analysé la cascade de signalisation ATR dépendante aux temps précoces de traitements HU (1h, 6h et 12h de traitement), par le suivi de la phosphorylation des protéines clés des cascades de signalisation activées en réponse au stress réplcatif. Alors que les lignées HeLa Contrôles activent leur point de contrôle intra-S as determined by the (analyses westerns blots), le profile de phosphorylation des protéines RPA, Chk1 et Smc1 dans les lignées Cdk5 KD est réduit six heures post traitements au HU, expliquant la déficience de l'activation du point de contrôle après un traitement transitoire à l'hydroxyurée. Lorsque le traitement au HU est induit en continu sur une période de plus de 12h, les fourches s'effondrent, cet effondrement est souvent associé à une accumulation de CDBs (Petermann et al., 2010). Dans ce contexte, nous avons analysé l'activation des points de contrôle intra-S et G2/M après 24 heures de traitement au HU (2mM) et montré leur altération en absence de Cdk5. L'exposition de nos deux lignées Contrôles et Cdk5 KD à une autre drogue induisant des effondrements de fourches, l'Aphidicoline, pendant 24 heures a également généré un défaut de l'activation des points de contrôle intra-S et G2/M dans les HeLa Cdk5 KD.

Nous avons voulu savoir si la kinase Cdk5 était directement responsable de la phosphorylation de la protéine RPA qui est nécessaire à l'activation d'ATR à la fourche de réplication suite à un traitement au HU. Par des tests *in-vitro* d'activité kinase et des analyses par spectrométrie de masse, j'ai pu montrer que Cdk5 phosphorylait RPA sur ses serines 23, 29 et 33. Ces résultats ont été confirmé *in vivo* par des analyses de western blots qui montrent une forte réduction de la phosphorylation des serines 29, 33 et S4S8 en réponse au HU et à l'Aphidicoline.

Ces phosphorylations de la protéine RPA étant essentielles pour l'induction de la réparation en phase S par RH, nous avons ensuite étudié la cinétique de phosphorylation de γ H2AX ainsi que la cinétique de formation des foyers RPA, RPA S4S8 et Rad51. Une diminution de ces marqueurs d'initiation de la réparation a été observée dans les lignées Cdk5 KD. J'ai également montré qu'après un traitement au HU, l'augmentation de la fréquence des échanges entre chromatides sœurs est moins importante en absence de Cdk5. Ces résultats appuient les

précédents et indiquent une forte réduction de la fréquence de la RH dans les lignées déficientes pour Cdk5.

Enfin, en collaboration avec le Dr Ivan Bieche (Institut Curie, Hôpital Saint Cloud), nous avons pu montrer qu'une faible expression de Cdk5 (par ARNm) dans les tumeurs était associée à un meilleur pronostic en termes de survie sans métastases pour des patientes atteintes d'un cancer du sein. Nous avons également étudié les conséquences d'une inhibition de Cdk5 par transfection d'un siRNA dirigé contre Cdk5 sur la réponse aux RI de deux lignées de cancer du sein (HCC1954 et BT549). Dans ces modèles, nous avons observé une sensibilisation accrue aux inhibiteurs de PARP en absence de traitement ainsi qu'une radiosensibilité augmentée, suggérant que la protéine Cdk5 pourrait être un bon marqueur de pronostic pour la réponse au traitement.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article qui suit.

Cdk5 promotes DNA replication stress checkpoint activation through RPA32 phosphorylation, and impacts on metastasis free survival in breast cancer patients

Sara Chiker 1,2,3, Vincent Pennaneach1,2, Damarys Loew4, Florent Dingli4, Denis Biard5, Fabrice P. Cordelières1,6,7***, Sophie Vacher8, Ivan Bieche8, Janet Hall1,2* and Marie Fernet1,2

1Institut Curie, Centre de Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France.

2Inserm, U612, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France.

3Université Paris-XI, Faculté de Médecine, F-94270, Le Kremlin Bicêtre, France.

4Institut Curie, Centre de Recherche, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Protéomique, F-75248 Paris, France.

5Commissariat à l'Energie Atomique, DSV-iMETI, F-92265 Fontenay aux Roses, France.

6CNRS, UMR3348, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France.

7Plateforme IBiSA d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Institut Curie, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay, France.

8Pharmacogenetics Unit, Genetics Service, Department of Tumour Biology, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex, France

***Present address: Bordeaux Imaging Center, UMS 3420 CNRS - Université de Bordeaux - US4 INSERM, Pôle d'imagerie photonique, Institut François Magendie, 146 Rue Léo-Saignat, F-33077 Bordeaux, France.

*Corresponding author: Janet Hall, Inserm U612, Institut Curie-Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France.

janet.hall@curie.fr

Tel: +33 (0)169863061

Fax: +33 (0)169075327

Running title: Cdk5, replicative stress and clinical outcome

Abstract

Cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) is a determinant of sensitivity to PARP inhibitors and ionizing radiation (IR) and is required for the intra-S DNA damage checkpoint. It is not however directly implicated in strand break repair suggesting a role in the earlier steps of checkpoint activation. We report here that Cdk5-depleted (Cdk5-KD) HeLa cells show higher sensitivity to IR when irradiated in S-phase, and to chronic hydroxyurea (HU) exposure, 5-fluorouracil and 6-thioguanine. Cdk5-KD cells show altered basal S-phase dynamics caused by a slower replication velocity and fewer active origins per megabase of DNA, however they show a faster recovery from an HU block. This was accompanied by impaired RPA-32 priming serine 29 and serine 33 phosphorylations and SMC1-Serine 966 phosphorylation as well as lower levels of DNA damage assessed by the alkaline Comet assay, gamma-H2AX signal intensity, RPA and Rad51 foci and RPA-32 serine 4 and serine 8 phosphorylation and levels of sister chromatid exchanges. In vitro kinase assays coupled with mass spectrometry showed that Cdk5 can phosphorylate RPA-32 on serines 23, 29, and 33. In addition lower Cdk5 levels were associated with longer metastasis free survival in breast cancer patients and lower cell survival in Cdk5 depleted breast tumor cells after treatment with IR and a PARP inhibitor. Taken together, these results show that Cdk5 is necessary for basal replication and replication stress checkpoint activation and opens up interesting clinical opportunities to enhance tumor cell killing in certain populations of breast cancer patients through agents that generate replication stress.

Keywords: Cdk5, Hydroxyurea, Replication stress, PARP-1, Ionizing Radiation

Introduction

Cyclin dependent kinase 5 (Cdk5), a proline directed serine/threonine kinase, modulates many different physiological process including migration (Xie et al., 2006), survival and synaptic functions (Contreras-Vallejos et al., 2012) in neurons. A link between Cdk5, DNA repair and cell cycle regulation has also been shown with Cdk5 phosphorylating Ape1 (Huang et al., 2010a), ATM and STAT3 (Hsu et al., 2013; Huang et al., 2010b; Tian et al., 2009). In non-neuronal cells the absence of Cdk5 was associated with a sensitization to camptothecin, cisplatin, poly(ADP) ribose polymerase (PARP) inhibitors (Bolin et al., 2012; Turner et al., 2008) and ionizing irradiation (IR) (Bolin et al., 2012) but not to methyl methane sulphonate or neocarzinostatin (Bolin et al., 2012). Thus although a high level of Cdk5 expression has been associated with tumor progression and metastasis (Eggers et al., 2011; Liang et al., 2013; Liu et al., 2011; Strock et al., 2006), the sensitivity of Cdk5 depleted cells would suggest that the low Cdk5 levels found in some tumors could be exploited for therapeutic benefit.

Previous studies from Turner et al. showed that Cdk5 is required for an efficient intra-S checkpoint in response to DNA damage (Turner et al., 2008). Cdk5 is however not directly required for either DNA double strand break (DSB) (Turner et al., 2008) or single strand break (SSB) repair (Bolin et al., 2012) suggesting that Cdk5 is necessary for an earlier step in the replicative stress response. One of the key steps is the priming phosphorylation of replicating protein A (RPA) subunit RPA32 on serines 23 (S23), 29 (S29) and 33 (S33) by cyclin-Cdk complexes and ATR followed by the hyper-phosphorylation on serines 4 (S4) and 8 (S8) that is mostly dependent on DNA-PK (Anantha et al., 2007). This sequential modification of RPA32 is necessary for checkpoint activation and DNA repair. Indeed the reduced hyper-phosphorylation at RPA-S4S8 has a direct consequence on Rad52 and Rad51 loading and recombination repair after replicative stress (Shi et al., 2010; Sleeth et al., 2007; Wu et al., 2005).

In the present study we sought to determine the impact of the absence of Cdk5 on cell survival, and cell cycle dynamics under basal growth conditions and in response to replicative stress. In addition we have assessed Cdk5 levels in breast tumors in relation to metastasis free survival (MFS) and using an in vitro approach, examined the impact of Cdk5 depletion on cell survival in two breast tumor models after treatment with IR and a PARP inhibitor.

Results

The depletion of Cdk5 expression results in lower cell survival and altered S-phase dynamics. The S-phase radioresistance, evaluated by the ratio of the surviving fraction after exposure to 2 Gy (SF2) for unsynchronised cells vs synchronized cells, was significantly lower in HeLa cells in which Cdk5 was stably depleted (Cdk5-KD) compared to Control cells (Bolin et al., 2012) (ratio 1.5 ± 0.16 for Control cells vs 1.06 ± 0.20 for Cdk5-KD cells, $P=0.004$) (Figure 1A and E). The Cdk5-KD cells also showed an increased sensitivity to chronic hydroxyurea (HU) exposure, 5-fluorouracil (5-FU) and 6 thioguanine (6-TG) (Figure 1B-D), all agents that disrupt replication. In addition the depletion of Cdk5 was associated with a slower basal rate of cell proliferation (Figure S1A) and S-phase progression (Figure S1B). The underlying cause was a significantly slower replication velocity compared to Control cells (median velocity 1.06 ± 0.03 Kb/min for Control and 0.87 ± 0.02 Kb/min for Cdk5-KD cells) as assessed by DNA combing (Figure 2A) and fewer active origins per megabase of DNA (Figure 2B). These data show that Cdk5 plays an active role in the regulation of replication dynamics under basal growth conditions.

Cdk5 is necessary for full activation of checkpoint signaling

In order to investigate Cdk5's role in the activation of the intra-S phase checkpoint we treated cells with HU that inhibits ribonucleotide reductase causing a rapid depletion of the dNTP pool resulting in a slowing of fork rate progression (Alvino et al., 2007) and the activation of ATR-dependent DNA replication checkpoints (Tourriere and Pasero, 2007). In contrast to basal growth conditions, after the induction of replicative stress Cdk5-KD cells show a faster recovery than Control cells (Figure 2C). The proportion of cells remaining in the S-phase 8 h after HU release was higher in Control compared to Cdk5-KD cells ($P=0.016$). This deficiency was also reflected in the statistically higher proportion of Cdk5-KD cells in G2/M ($P=0.02$) seen from 8 h to 16 h after HU release (Figure 2C) and a doubling of the number of mitotic cells ($P=0.0015$) (Figure 2D) 16 h after HU release compared to Control cells. The observation that a similar cell cycle profile was observed when cells were treated with aphidicolin, that disrupts replication by inhibiting DNA polymerases (Hustedt et al., 2013) (Figure S2A), rules out the possibility that the differences between the Cdk5-KD and Control

cells are related to dNTP pool sizes. These results support a role for Cdk5 in the activation of the intra-S checkpoint as previously reported (Turner et al., 2008).

Two parameters that ensure the activation of the intra-S checkpoint are the replication fork velocity and fork density which are essential to maintain replication fork stability and block the initiation of latent origins (Ge and Blow, 2010; Lambert and Carr, 2005; Maya-Mendoza et al., 2007). As reported (Alvino et al., 2007), HU treatment reduced the fork speed in Control cells (Figure 2A) from 1.06 kb/min in untreated cells to 0.80 kb/min after HU treatment and resulted in a decrease in fork density from 8.4 to 5.6 forks/Mb in HU treated Control cells (Figure 2B). HU treatment had a negligible effect on fork speed in Cdk5-KD cells with the velocities seen comparable to those in HU treated Control cells (from 0.87 kb/min in untreated Cdk5-KD cells to 0.78 kb/min in HU treated Cdk5-KD cells). In contrast an increase in fork density after HU treatment in the absence of Cdk5, from 6.4 in untreated cells to 8.7 forks/Mb, was observed. These results suggest Cdk5 is required to inhibit the firing of late origins during replicative stress, providing an explanation as to why Cdk5-KD cells recover faster from a HU-block than Control cells.

Impaired RPA32 phosphorylation in Cdk5-KD cells after replicative stress

One of the first signals of replication stress is the accumulation of ssDNA at the replication fork that arises from the uncoupling of the replicative helicases and DNA polymerases (Magdalou et al., 2014; Paulsen and Cimprich, 2007). Once formed this ssDNA is coated by RPA and acts as a signaling platform for the recruitment of the ATR-ATRIP complex, the activation of ATR and the subsequent phosphorylation of down-stream effector proteins required for the activation of the DNA replication damage checkpoint (Branzei and Foiani, 2009; Xu et al., 2008). In order to analyze the consequences of Cdk5 depletion on this cascade of ATR-dependent signaling events, we next assessed the early steps during and up to 24 h after an HU block. Six h after the start of the block a clear reduction in the level of the phosphorylation of Chk1-S317 was seen in the Cdk5-KD cells providing an explanation for the higher fork density observed compared to the Control cells (Figure 3A) and by 24 h significantly lower maximum levels of SMC1-S966 and RPA32-S33 and S29 phosphorylation were seen in the Cdk5-KD compared to the Control cells (Figure 3B). Reduced RPA32 S4, S8, S33 and SMC1-S966 phosphorylation was also observed 24 h after aphidicolin (2.5  g/ml) treatment (Figure S2). However no clear differences in the dephosphorylation patterns of these proteins between the Controls and Cdk5-KD cells were noted after the block release.

The lower *in vivo* levels of RPA32 phosphorylation in Cdk5-KD cells led us to investigate whether Cdk5 could phosphorylate RPA32 on the same sites as reported for Cdk1 and Cdk2 (Dutta and Stillman, 1992; Fang and Newport, 1993; Niu et al., 1997) and ATR (Olson et al., 2006). Using *in vitro* kinase assays followed by mass spectrometry analysis we found that Cdk5 phosphorylated RPA32 (Figure 3C) on positions S23, S29 and S33 (Figure 3D, Figure S3). Under the same experimental conditions, active Cdk1 and Cdk2 also phosphorylate these 3 positions but a significantly lower relative frequency of these events was detected (Figure S3D). These results suggest that Cdk5 carries out these three priming phosphorylations that normally requires the synergistic action of the cyclin-Cdks and PIKK (Anantha et al., 2007).

Depletion of Cdk5 expression impacts on the later steps of the DNA damage response

The altered RPA-32 phosphorylation profile in response to HU in the absence of Cdk5 led us to compare the global DNA damage in the two cell types using the alkaline comet assay (Azqueta and Collins, 2013). No significant difference in the level of IR induced DNA damage was noted and identical damage levels remained 1 h post-radiation (Figure 4A) suggesting that DNA strand break repair *per se* was not deficient in the Cdk5-KD cells. In contrast DNA damage levels after exposure to HU was significantly lower in Cdk5-KD compared to Control cells (Figure 4B). This lower level was confirmed using two additional endpoints. Firstly the gamma-H2AX signal intensity observed 24 h into the HU block and up to 12h after release was lower in Cdk5-KD compared to Control cells ($P < 0.001$ - < 0.05 respectively) (Figure 4C). Secondly, a smaller percentage of Cdk5-KD cells contained RPA foci after HU treatment compared to Control cells ($P = < 0.0001$) (Figure 4D). These data are consistent with a lower level of ssDNA and thus a failure to fully activate RPA dependent checkpoint signaling in the absence of Cdk5.

Prolonged HU exposure leads to fork breakage and DSB formation. The resection of these DSBs can be assessed using as an endpoint the quantification of RPA32-S4S8 phosphorylation and the subsequent accumulation of Rad51 foci formation after HU treatment (Illuzzi et al., 2014). RPA32-S4S8 phosphorylation as measured in protein extracts of cells treated with HU showed a slower induction and reached significantly lower levels ($P = 0.0019$) in the Cdk5-KD compared to the Control cells (Figure 5A). A statistically lower number of RPA32-S4S8 foci was observed in S-phase Cdk5-KD compared to Controls cells after the HU block and also 8 h after release, the time point when DSB repair occurs (Petermann et al., 2010) (Figure 5B). In agreement with this lower number of RPA32-S4S8 foci, S-phase Cdk5-KD cells had statistically fewer Rad51 foci after the HU block and 8 h

after release ($P < 0.0001$) (Figure 5C), indicating a reduction in homologous recombination (HR) activity. The Cdk5-KD cells did however show a higher number of Rad51 foci 24 h after release compared to Control cells, indicating the persistence of some unrepaired residual breaks.

In order to investigate the longer term effects of Cdk5 deficiency, we quantified the formation of sister chromatid exchanges (SCEs) which relies on a functional HR pathway in cells after HU treatment (Figure 6). HU treatment induces a 7-fold increase in SCE numbers in Control cells compared to untreated cells but only a 3-fold increase in Cdk5-KD cells. This lower HU-induced HR is in agreement with the results from the other endpoints that demonstrate that Cdk5 is necessary for promoting the full and timely activation of the cascade of events initiated in response to replication stress.

Lower Cdk5 expression is associated with higher MFS in breast cancer patients and increased in vitro sensitivity to cell killing by PARP inhibition and IR

As many cytotoxic anti-cancer treatments target proliferating cells by interfering with DNA replication and Cdk5 appears essential for this response, we investigated whether its expression profile in a panel of 456 breast tumors was associated with clinical outcome in terms of MFS. Low Cdk5 mRNA levels (≤ 3.8 fold relative to that seen in normal tissues) was associated with longer MFS ($P = 0.0078$; Figure 7A). In a sub-set ($n = 233$) of tumors Cdk5 protein expression was also evaluated using a RPPA approach and a similar association between lower Cdk5 expression and longer MFS observed ($P = 0.047$; data not shown). No association between high Cdk5 expression (> 3.8 fold) and age of onset or Scarff Bloom Richardson histological grade were found but high Cdk5 expression was more frequently seen in tumors in which ERBB2 was over-expressed, ERBB2 positive molecular subtypes and in highly proliferating tumors with high KI67 mRNA levels (Supplemental Table 1).

In order to investigate whether radiation sensitivity in breast tumor cells could be influenced by the depletion of Cdk5 we transfected HCC1954 and BT549 breast tumor cells, chosen from a panel of over 30 breast cancer lines based on their relatively low Cdk5 mRNA levels (Bieche et al., unpublished data), with a Cdk5 targeting or control siRNA and assessed cell survival. Either Cdk5 depletion or PARP inhibition resulted in lower numbers of cell colonies compared to the transfection of the parental line with a control siRNA. However depletion of Cdk5 (Figure 7D) and inhibition of PARP activity together compared to either treatment individually significantly lowered survival only in BT549 cells (Figure 7B). In both models

the depletion of Cdk5 was associated with increased radiation sensitivity (Figure 7C) which could be furthered lowered by the combined treatment of IR and PARP inhibition.

Discussion

Recent studies have demonstrated that Cdk5 is functionally important in different types of cells and in various physiological and pathophysiological contexts (Arif, 2012; Liebl et al., 2011) and can impact on cell growth and migration (Liebl et al., 2010; Xu et al., 2014), apoptosis (Ajay et al., 2010; Upadhyay et al., 2008), tumour progression (Eggers et al., 2011; Liang et al., 2013; Liu et al., 2011; Strock et al., 2006), cell cycle regulation and DNA damage response (Bolin et al., 2012; Nagano et al., 2013; Turner et al., 2008). Our study has identified a novel role for Cdk5 in S-phase cell cycle progression under basal growth conditions in the absence of genotoxic stress. The observations that the proportion of cells with RPA foci was higher and more RPA32S4S8 foci/cell were seen in S-phase Cdk5-KD cells under basal growth conditions compared to Control cells is in agreement with the increased spontaneous replication stress in Cdk5-KD cells and the reduced S-phase kinetics observed under basal conditions. In addition we have shown that Cdk5 is necessary for full checkpoint activation in response to replication stress.

There are a number of reports in the literature that support a role for Cdk5 in basal replication. Cdk5 was identified as a partner of the proliferating cell nuclear antigen, a key replication protein (Loor et al., 1997) and Xu et al. (Xu et al., 2014) recently reported impaired proliferation in Cdk5 depleted breast cancer cells. Nagano and colleagues showed a direct *in vivo* interaction of Cyclin I and Cdk5 and the involvement of Cyclin I in S-phase cell cycle proliferation (Nagano et al., 2013). Thus it is tempting to speculate that Cdk5 may interact with Cyclin I during the replication process. The observation of higher PAR levels in Cdk5 depleted cells (Bolin et al., 2012) could provide an explanation for the slower fork velocity under basal growth conditions. However PARG depleted cells provide no evidence for an impact of higher polymer levels on cell cycle progression (Ame et al., 2009) this is unlikely to be the cause.

In addition to a slower S-phase progression under normal growth conditions, the absence of Cdk5 is associated with a perturbation of S-phase dynamics after treatment with both transient and prolonged HU treatment. The inhibition of ribonucleotide reductase by HU has distinct consequences depending on the treatment time: transient exposures result in the stalling of replication forks requiring an ATR-RPA dependent pathway to stabilize the stalled forks,

whereas prolonged HU exposure leads to fork collapse requiring either the initiation of dormant origins or the repair of collapsed forks through HR for replication restart (Bolderson et al., 2014; Illuzzi et al., 2014; Petermann and Helleday, 2010; Petermann et al., 2010). The absence of Cdk5 impacted on both treatment profiles highlighting its central role in replication dynamics. Under transient HU exposure the reduction in fork velocity seen in Control cells was less marked in Cdk5-KD cells but was accompanied by a reduced phosphorylation of RPA-32 on S33 and S29 in vivo. This is in agreement with observations that RPA phosphorylation can inhibit DNA replication (Carty et al., 1994; Oakley and Patrick, 2010; Patrick et al., 2005) and suggests that DNA synthesis arrest after HU induced replication stress may be mediated in part by the phosphorylation of RPA-32 by Cdk5. The sequential phosphorylation of RPA-32 is a key event in checkpoint activation and DNA repair with the priming phosphorylations on S23, S29 and S33 being an essential step (Anantha et al., 2007). It has been reported that S23 and S29 can be phosphorylated in vitro by Cdk1 and Cdk2 (Dutta and Stillman, 1992; Fang and Newport, 1993; Niu et al., 1997; Treuner et al., 1999) and ATR is considered the PIKK that phosphorylates S33 (Vassin et al., 2009). Our in vitro data suggests that whilst Cdk1, Cdk2 and Cdk5 can phosphorylate all these serines, Cdk5 shows a higher affinity for the three sites. Taken together with the in vivo data, our results confirm Cdk5 as a novel member of the Cdk/PIKK families necessary for the S-phase DNA damage response through a mechanism involving RPA-32 phosphorylation.

In terms of the phosphorylation cascades initiated in response to replication stress Chk1 is a direct target of ATR's kinase activity resulting in its phosphorylation on S317. This phosphorylation event is essential for the inhibition of origin firing through a mechanism involving Cdc25A phosphatase stability (Jones and Petermann, 2012). In the absence of Cdk5 Chk1-S317 phosphorylation was delayed during the early stages of the HU block, although by 24 h into the HU block no differences between the Control and Cdk5-KD depleted cells were seen. These results would suggest that Cdk5 is necessary for the initial priming phosphorylation of RPA-32 and suggests that full RPA-32 phosphorylation is not necessary for Chk1 activation in agreement with observations of Sleeth et al. (Sleeth et al., 2007). The lower levels of these RPA-32 priming phosphorylations impact on the hyper-phosphorylation on S4/S8 seen after prolonged HU treatment. This hyper-phosphorylation is a key step in the initiation of HR initiating events, and reduced HR events, as measured by Rad51 foci and SCE levels, were seen in the absence of Cdk5. It has been reported that PARP-1 binds to and is activated by stalled replication forks to promote replication fork restart after release from replication blocks (Bryant et al., 2009). However despite the observations that Cdk5-KD cells

have higher levels of DNA damage induced polymer compared to control cells (Bolin et al., 2012), we could not find any evidence that the absence of Cdk5 impacts on fork restart (Figure S4). We also observe less ssDNA formed during HU treatment in Cdk5-KD compared to Control cells. The formation of ssDNA is a marker of the functional uncoupling of the replicative helicases and DNA polymerases and this lower level raises the possibility that Cdk5 promotes this process at stalled replication forks, a function that has also been attributed to the helicase MCM (Byun et al., 2005).

Based on the cellular and molecular phenotype of Cdk5-KD cells it is tempting to speculate that the absence of Cdk5 in tumors could be exploited for therapeutic benefit as such tumors are more likely to be sensitive to killing by certain treatments. Indeed Cdk5 loss was identified as a determinant of sensitivity to PARP inhibitors (Turner et al., 2008). A better understanding of the gene interactions and functional buffering that occur in tumor cells, together with a measure of the heterogeneity found between different tumors, is important for the development of new therapeutic approaches (Ashworth et al., 2011). Over the past few years significant advances have been made to directly target such changes through for instance the use of DNA repair and cell cycle inhibitors. Whether inter-individual differences in tumor Cdk5 expression profiles can be exploited to clinical advantage remains to be fully investigated. Recently Levacque et al. (Levacque et al., 2012) reported that Cdk5 expression levels predicts the survival of relapsed multiple myeloma patients to the proteasome inhibitor bortezomib, with individuals with Cdk5 expression in the bottom quartile having significantly higher survival compared with those with Cdk5 in the top quartile. Our observation that significantly longer MFS was associated with breast tumors with lower Cdk5 mRNA expression is in agreement with Liang et al. (Liang et al., 2013) who found in a panel of 108 breast tumors that the over-expression of Cdk5 protein expression was significantly correlated with several poor prognosis markers (ER- ($P < 0.001$), basal-like ($P < 0.001$) and high grade of malignancy ($P < 0.001$). It has to be noted however that differences exist between the two studies in some associations which may be due to differences in study sizes, the distribution of the breast tumor subtypes within the cohorts and the criteria for over-expression. As no Cdk5 inhibitors with specificity and selectivity are available to date (Cuny, 2009) and based on the mechanistic role of Cdk5 in the response to replicative stress, the therapeutic use of PARP inhibitors combined with radiotherapy could be one promising avenue for tumors with low Cdk5 expression. Such an approach would exploit the S-phase cell cycle dependency of PARP inhibition (Godon et al., 2008) and the increased S-phase radiosensitivity associated with the loss of Cdk5 expression. In the two breast tumor models tested the radiation

sensitivity was increased by PARP inhibitor and further increased when Cdk5 was depleted. Whilst clearly such an approach exploiting replicative stress would require further validation and optimization in more models, it could be applicable to many of the different tumor types in which Cdk5 expression has been shown to be down-regulated.

Materials and methods

Cell lines and drugs

shRNA design and cloning in pEBVsiRNA vectors carrying a hygromycin B resistance cassette, the establishment and growth of stable knockdown Cdk5-KD clones and HeLa cells carrying the pBD650 plasmid that expresses an inefficient shRNA sequence were used as Controls and was carried out as previously described (Biard, 2007; Bolin et al., 2012). The RNAi targeted sequences for Cdk5 (NM_004935) were nucleotides 703-721 for clone 1499, nucleotides 455-473 for clone 1500. Breast cancer cells BT549 and HCC1954 were obtained from T. DuBois (Transfer Department, Institut Curie, Paris, France). All tissue culture reagents were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France) and 5-FU, HU and 6-TG from Sigma-Aldrich (France).

Cell growth and colony formation survival assays

To assess cell growth, cells were plated in complete medium (3.105 per 25 cm² flask/line) and counted each day. For clonogenic survival after treatment with DNA damaging agents, Control (800 cells) and Cdk5 KD (1600 cells) cells were plated in 25 cm² flasks in triplicate, and allowed to adhere for 4 h at 37°C before treatment. Flasks were either irradiated at room temperature using a ¹³⁷Cs gamma irradiator or treated with increasing concentrations of various drugs added directly to the culture medium. To assess cell survival when irradiated in the S-phase of the cell cycle, cells were synchronized at the G1–S junction by treating them 13 h with 10 µM thymidine (Sigma-Aldrich), then washed and placed in fresh medium for 9h and reblocked with 10 µM thymidine for 20 h. Two hours after removal of thymidine, cells were harvested for plating and clonogenic assays. In order to confirm synchronization, cell cycle distribution was monitored by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis using a FACSCalibur cytofluorometer (Becton-Dickinson Biosciences) after bromodeoxyuridine (BrdU) pulse labeling (10 µM, 15 min) as described previously (Fernet et al., 2010). To assess cell survival after the depletion of Cdk5, HCC1954 and BT549 cells were transfected with siRNA (20 µM) directed against Cdk5 (Supplementary Table 2) or a negative control (siRNA duplex, 5 nmol, SR-CL000-005, Eurogentec) using interferin reagent (Polyplus transfection)

following manufacturer's instructions. 72 h post-transfection cells were treated or not to the PARP inhibitor (ABT888, Enzo Life Sciences, 10 μ M) for 1h prior to irradiation.

The colony count relative to mock-irradiated cells (relative cell survival) was adjusted for best fit to the classical linear-quadratic equation ($\ln S = -\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2$) where D is the radiation dose and α and β adjustable parameters characterizing the response, using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, Pennsylvania). Relative cell survival curves after other treatments were fitted with a linear quadratic or an exponential fit.

Flow cytometry analysis

To assess the mitotic ratio cells were treated with HU (24 h, 2 mM), transferred to fresh medium containing 50 μ g/ μ l nocodazole (Sigma-Aldrich) and analysed at the indicated times as described (Fernet et al., 2010). Phospho-histone H3 immunostaining of mitotic cells was carried out as described (Fernet et al., 2010). Flow cytometric analysis was performed using a FACSCalibur cytofluorometer (Becton-Dickinson Biosciences). At least 104 events were recorded and data analysis was done with CellQuest Pro software (Becton-Dickinson Biosciences).

Western blotting

Total protein extracts were obtained after collection of cells by scraping in extraction buffer (62.5 mM Tris HCl, 2% SDS 10% Glycerol, 50 mM DTT, 0.01% bromophenol). Protein expression and phosphorylation was analysed and quantified as described (Fernet et al., 2010). Full details of antibodies used are given in Supplementary Table 3.

Immunofluorescence protein detection

For the detection of Rad51 and phospho-RPA foci, cells grown on coverslips were pulse-labelled (10 μ M BrdU, 30 min), and incubated (1 h) with primary antibodies for Rad51 or RPA or phospho-RPA32 S4S8 After incubation with secondary antibodies cells were fixed (5 min, 1% paraformaldehyde) and stained with anti-BrdU antibody. Coverslips were mounted with Vectashield containing DAPI 1.5 μ g/ml (Vector Laboratories). Images of fields were acquired automatically on a SPINNING-DISC/TIRF/FRAP system, based on a Nikon Ti Eclipse stand, equipped with a 60x/1.48 objective and a Yokogawa CSU confocal scanning head. Sets of images were acquired using an Evolve EM-CCD camera (Photometrics), under control of the Metamorph software (Molecular Devices) using its "mosaic scan" option. At least 500 cells were analyzed per experimental condition. The number of foci was quantified

using a macro in arbitrary units (A.U.) using Image J software. For Phospho-RPAS4S8 foci and Rad51 foci only cells in S-phase were analyzed as determined by BrdU staining intensity

RPA and Cdk5 kinases Assay

For in vitro kinase assays 1 - 4 µg purified RPA-32 recombinant protein (Abcam) was incubated (30 min, 30°C) with 0.5 ng active Cdk5, Cdk1 or Cdk2 (Millipore) in the presence of 10 µCi [γ -³²P]-ATP and separated by SDS-PAGE. The phosphorylation of substrates was analyzed by autoradiography. Histone H1 was used a positive control.

Mass spectrometry analysis

Samples were analyzed using a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (MS, Thermo Scientific) coupled to a nano-Liquid Chromatography system (LC, Ultimate 3000, dionex). Details of the separation and MS parameters are provided as Supplementary Information.

Sister Chromatid Exchange Assays

The measurement of Sister Chromatid Exchanges (SCEs) was carried out as previously described (Lahkim Bennani-Belhaj et al., 2010). In brief cells were grown on coverslips in the presence or not of HU (2 mM) and 5-BrdU (10 µM). After 46h, colchicine (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 0.1 mg/ml for 1 h. Cells were then incubated in a hypotonic solution (1:6 (vol/vol, FBS:distilled:water) and fixed with methanol:acetic acid dilutions. After staining with 10 mg/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) in distilled water for 20 min, cells were rinsed with 2 x SSC (Euromedex) and exposed to UV light at 365nm at a distance of 10cm for 105 min, rinsed in distilled water, stained with 2% Giemsa solution (VWR) for 16 min, rinsed in distilled water, dried, and mounted. Chromosomes were observed with a Leica DMRB microscope at 100x magnification. Metaphases were captured with a SONY DXC 930 P camera, and SCEs counted manually by two observers blind to the knowledge of cell line status.

Molecular Combing

Molecular combing was performed as previously described (Michalet et al., 1997) with some modifications to the protocol. Briefly asynchronous cell populations were labelled with Iododeoxyuridine (IdU) and chlorodeoxyuridine (CldU) (30 min pulse labeling of first 20 µM IdU then 100 µM CldU). Agarose plugs were digested by proteinase K (48 h at a dose of 1mg/ml) then β -agarase (48 h at 42°C). Chromatin fibers were combed and incubated with rat anti-BrdU antibody (1:25, OBT0030, clone BU1/75 ICR1; AbD Serotec) and FITC-

conjugated mouse anti-BrdU (1:5, 347583, clone B44; BD Biosciences) for 1 h at 37 °C. After a short wash step (0.5 M NaCl, 20 mM Tris at pH 7.8, and 0.5% Tween 20), the fibers were incubated with goat anti-mouse Alexa 488 (1:50, A-11029; Invitrogen) and goat anti-rat Alexa 594 (1:50, A-11007; Invitrogen) for 1 h. DNA counter-staining was performed by using anti-DNA antibody (1:20, MAB3034, clone 16–19; Millipore) and the following two secondary antibodies: rabbit anti mouse 350 (AlexaFluor) and goat anti rabbit 350 (AlexaFluor). For each condition, at least 200 fibers were analyzed. Images were acquired with a Leica DM RXA microscope equipped with a motorized XY stage, using a X40 PlanApo N.A. 1.25 objective and a CoolSNAP HQ interline CCD camera (Photo-metrics). For each slide, a mosaic of 10×10 partly overlapping images was collected with a Metamorph software (Molecular Devices) routine developed in-house. Image collections were assembled into a mosaic with the ‘Stitching 2D/3D’ plugin³² (available from <http://fly.mpi-cbg.de/~preibisch/software.html>) for ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2009).

Comet assay

Cells were either grown on coverslips, treated in situ with 2 mM HU and collected by trypsinization, and then suspended in 0.5% low melting point agarose and transferred onto a microscope slide precoated with agarose or treated directly with gamma-radiation on the agarose slides. Comets were performed in alkaline conditions as described previously (Rimmele et al., 2010). The tail moment, defined as the product of the percentage of DNA in the tail and the displacement between the head and the tail of the comet, was measured for more than 200 cells for each experimental condition in two independent experiments.

Gamma-H2AX measurement by FACS

HU-induced gamma-H2AX intensity was assessed as described (Haddy et al., 2014). Mean gamma-H2AX intensity was calculated at each time-point for each cell line in three independent experiments.

Patients and biological samples

Primary unilateral non-metastatic breast carcinoma samples were obtained from 456 patients (mean age 61.7 years, range 31–91) who had surgery at Institut Curie’s René Huguenin Hospital (Saint-Cloud, France) between 1978 and 2008 in accordance with national law and institutional guidelines under a protocol approved by the local Ethics Committee. Samples

were immediately stored in liquid nitrogen until RNA extraction and considered suitable for inclusion if the proportion of tumour cells was more than 70% as assessed by histology.

All individuals met the following criteria: availability of complete clinical, histological and biological; no radiotherapy or chemotherapy before surgery; full follow-up. 291 patients (63.8%) underwent modified radical mastectomy and 165 (36.2%) had breast-conserving surgery with loco-regional radiotherapy. Patients underwent physical examinations and routine chest radiography every 3 months for 2 years, then annually. Mammograms were done annually.

Ten specimens of adjacent normal breast tissue from 10 breast cancer patients or normal breast tissue from women undergoing cosmetic breast surgery were used as sources of RNA for comparative purposes.

RNA extraction and Quantitative Real-time PCR

Total RNA was extracted from breast samples using the acid-phenol guanidinium method as described elsewhere (Bieche et al., 2013). Primers for TBP (Genbank accession NM_003194), encoding the TATA box-binding protein and used as an endogenous RNA control, and the Cdk5 gene are given in Supplementary Table 2. The cDNA synthesis, PCR reaction conditions and quantification of transcript levels were carried out as previously (Bieche et al., 2001). Results, expressed as N-fold differences in Cdk5 gene expression relative to the TBP gene, termed "NCdk5", were determined by the formula: $NCdk5 = 2^{\Delta Ct_{sample}}$, where ΔCt value of the sample was determined by subtracting the average Ct value of the Cdk5 gene from the average Ct value of the TBP gene. The NCdk5 values of the samples were subsequently normalized such that the median of the ten normal breast tissue NCdk5 values was 1.

Statistics

To compare data from Control and Cdk5-KD cells and for combining analysis a Mann-Whitney test was used. The comparison between Cdk5 mRNA expression levels and clinical parameters was assessed using nonparametric tests: the Mann-Whitney U test (between 1 qualitative parameter and 1 quantitative parameter) and the Spearman rank correlation test (between 2 quantitative parameters). To visualize the efficacy of Cdk5 mRNA levels to discriminate between patients that developed/did not develop metastases in the absence of an arbitrary cut-off value, data were summarized in a receiver operating characteristic curve (Hanley and McNeil, 1982). The area under the curve (AUC) was calculated as a single

measure to discriminate efficacy. MFS was determined as the interval between initial diagnosis and detection of the first relapse metastasis. Survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method (Kaplan EL, 1958), and the significance of differences between survival rates was ascertained using the log-rank test (Peto et al., 1977). All others data presented, were analyzed using unpaired T-tests using Prism Graph Pad 5.0b software (GraphPad Software Inc).

Acknowledgements

We thank Sarah Lambert and Patricia Kannouche for helpful discussions, Christophe Roulin, Frederic Pouzoulet, Géraldine Buhagiar and Stéphane Koundrioukoff (Institut Curie) for technical advice and Claire Grosu for technical help. The gift of RPA-S23 and RPA-S29 antibodies by Heinz Nasheuer and James Borowiec is gratefully acknowledged. Inserm U612's research is supported by Inserm and Institut Curie and is part of the Comprehensive Cancer Centre "SIRIC" program (INCa 2011-189). SC received a PhD fellowship from the French Ministry of Research. We acknowledge the PICT-IBiSA [Institut Curie, Orsay] member of the France-BioImaging national research infrastructure and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM N° DGE20111123020).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ajay, A.K., Upadhyay, A.K., Singh, S., Vijayakumar, M.V., Kumari, R., Pandey, V., Boppana, R., and Bhat, M.K. (2010). Cdk5 phosphorylates non-genotoxically overexpressed p53 following inhibition of PP2A to induce cell cycle arrest/apoptosis and inhibits tumor progression. *Molecular cancer* 9, 204.
- Alvino, G.M., Collingwood, D., Murphy, J.M., Delrow, J., Brewer, B.J., and Raghuraman, M.K. (2007). Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol Cell Biol* 27, 6396-6406.
- Ame, J.C., Fouquerel, E., Gauthier, L.R., Biard, D., Boussin, F.D., Dantzer, F., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2009). Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells. *J Cell Sci* 122, 1990-2002.
- Anantha, R.W., Vassin, V.M., and Borowiec, J.A. (2007). Sequential and Synergistic Modification of Human RPA Stimulates Chromosomal DNA Repair. *Journal of Biological Chemistry* 282, 35910-35923.
- Arif, A. (2012). Extraneuronal activities and regulatory mechanisms of the atypical cyclin-dependent kinase Cdk5. *Biochem Pharmacol* 84, 985-993.
- Ashworth, A., Lord, C.J., and Reis-Filho, J.S. (2011). Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell* 145, 30-38.
- Azqueta, A., and Collins, A.R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of toxicology* 87, 949-968.
- Biard, D.S. (2007). Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* 35, 3535-3550.
- Bieche, I., Parfait, B., Le Doussal, V., Olivi, M., Rio, M.C., Lidereau, R., and Vidaud, M. (2001). Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. *Cancer Res* 61, 1652-1658.
- Bieche, I., Pennaneach, V., Driouch, K., Vacher, S., Zaremba, T., Susini, A., Lidereau, R., and Hall, J. (2013). Variations in the mRNA expression of poly(ADP-ribose) polymerases, poly(ADP-ribose) glycohydrolase and ADP-ribosylhydrolase 3 in breast tumors and impact on clinical outcome. *International journal of cancer Journal international du cancer* 133, 2791-2800.
- Bolderson, E., Petermann, E., Croft, L., Suraweera, A., Pandita, R.K., Pandita, T.K., Helleday, T., Khanna, K.K., and Richard, D.J. (2014). Human single-stranded DNA binding protein 1 (hSSB1/NABP2) is required for the stability and repair of stalled replication forks. *Nucleic Acids Res* 42, 6326-6336.
- Bolin, C., Boudra, M.T., Fernet, M., Vaslin, L., Pennaneach, V., Zaremba, T., Biard, D., Cordelieres, F.P., Favaudon, V., Megnin-Chanet, F., et al. (2012). The impact of cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP-ribose) polymerase activity and responses to radiation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 951-962.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2009). The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair (Amst)* 8, 1038-1046.
- Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.-S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., and Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *The EMBO Journal* 28, 2601-2615.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* 19, 1040-1052.
- Carty, M.P., Zernik-Kobak, M., McGrath, S., and Dixon, K. (1994). UV light-induced DNA synthesis arrest in HeLa cells is associated with changes in phosphorylation of human single-stranded DNA-binding protein. *EMBO J* 13, 2114-2123.

- Contreras-Vallejos, E., Utreras, E., and Gonzalez-Billault, C. (2012). Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5. *Cell Signal* 24, 44-52.
- Cuny, G.D. (2009). Kinase inhibitors as potential therapeutics for acute and chronic neurodegenerative conditions. *Current pharmaceutical design* 15, 3919-3939.
- Dutta, A., and Stillman, B. (1992). cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DNA replication factor, RPA, and activate DNA replication. *EMBO J* 11, 2189-2199.
- Eggers, J.P., Grandgenett, P.M., Collisson, E.C., Lewallen, M.E., Tremayne, J., Singh, P.K., Swanson, B.J., Andersen, J.M., Caffrey, T.C., High, R.R., et al. (2011). Cyclin-dependent kinase 5 is amplified and overexpressed in pancreatic cancer and activated by mutant K-Ras. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6140-6150.
- Fang, F., and Newport, J.W. (1993). Distinct roles of cdk2 and cdc2 in RP-A phosphorylation during the cell cycle. *Journal of Cell Science* 106, 983-994.
- Fernet, M., Megnin-Chanet, F., Hall, J., and Favaudon, V. (2010). Control of the G2/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: implications for hyper-radiosensitivity. *DNA Repair (Amst)* 9, 48-57.
- Ge, X.Q., and Blow, J.J. (2010). Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J Cell Biol* 191, 1285-1297.
- Godon, C., Cordelieres, F.P., Biard, D., Giocanti, N., Megnin-Chanet, F., Hall, J., and Favaudon, V. (2008). PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res* 36, 4454-4464.
- Haddy, N., Tartier, L., Koscielny, S., Adjadj, E., Rubino, C., Brugieres, L., Pacquement, H., Diallo, I., de Vathaire, F., Averbeck, D., et al. (2014). Repair of ionizing radiation-induced DNA damage and risk of second cancer in childhood cancer survivors. *Carcinogenesis* 35, 1745-1749.
- Hanley, J.A., and McNeil, B.J. (1982). The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143, 29-36.
- Hsu, F.-N., Chen, M.-C., Lin, K.-C., Peng, Y.-T., Li, P.-C., Lin, E., Chiang, M.-C., Hsieh, J.-T., and Lin, H. (2013). Cyclin-dependent kinase 5 modulates STAT3 and androgen receptor activation through phosphorylation of Ser727 on STAT3 in prostate cancer cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 305, E975-E986.
- Huang, E., Qu, D., Zhang, Y., Venderova, K., Haque, M.E., Rousseaux, M.W., Slack, R.S., Woulfe, J.M., and Park, D.S. (2010a). The role of Cdk5-mediated apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 phosphorylation in neuronal death. *Nat Cell Biol* 12, 563-571.
- Huang, E., Qu, D., Zhang, Y., Venderova, K., Haque, M.E., Rousseaux, M.W.C., Slack, R.S., Woulfe, J.M., and Park, D.S. (2010b). The role of Cdk5-mediated apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 phosphorylation in neuronal death. *Nature Cell Biology* 12, 563-571.
- Hustedt, N., Gasser, S.M., and Shimada, K. (2013). Replication checkpoint: tuning and coordination of replication forks in s phase. *Genes (Basel)* 4, 388-434.
- Illuzzi, G., Fouquerel, E., Ame, J.C., Noll, A., Rehmet, K., Nasheuer, H.P., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2014). PARG is dispensable for recovery from transient replicative stress but required to prevent detrimental accumulation of poly(ADP-ribose) upon prolonged replicative stress. *Nucleic Acids Res* 42, 7776-7792.
- Jones, R.M., and Petermann, E. (2012). Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochemical Journal* 443, 13-26.
- Kaplan EL, M.P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* 53, 457-481.
- Lahkim Bennani-Belhaj, K., Rouzeau, S., Buhagiar-Labarchede, G., Chabosseau, P., Onclercq-Delic, R., Bayart, E., Cordelieres, F., Couturier, J., and Amor-Gueret, M. (2010).

- The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Molecular cancer research : MCR* 8, 385-394.
- Lambert, S., and Carr, A.M. (2005). Checkpoint responses to replication fork barriers. *Biochimie* 87, 591-602.
- Levacque, Z., Rosales, J.L., and Lee, K.Y. (2012). Level of cdk5 expression predicts the survival of relapsed multiple myeloma patients. *Cell Cycle* 11, 4093-4095.
- Liang, Q., Li, L., Zhang, J., Lei, Y., Wang, L., Liu, D.X., Feng, J., Hou, P., Yao, R., Zhang, Y., et al. (2013). CDK5 is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Scientific reports* 3, 2932.
- Liebl, J., Furst, R., Vollmar, A.M., and Zahler, S. (2011). Twice switched at birth: cell cycle-independent roles of the "neuron-specific" cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in non-neuronal cells. *Cell Signal* 23, 1698-1707.
- Liebl, J., Weitensteiner, S.B., Vereb, G., Takacs, L., Furst, R., Vollmar, A.M., and Zahler, S. (2010). Cyclin-dependent kinase 5 regulates endothelial cell migration and angiogenesis. *J Biol Chem* 285, 35932-35943.
- Liu, J.L., Wang, X.Y., Huang, B.X., Zhu, F., Zhang, R.G., and Wu, G. (2011). Expression of CDK5/p35 in resected patients with non-small cell lung cancer: relation to prognosis. *Medical oncology* 28, 673-678.
- Loor, G., Zhang, S.J., Zhang, P., Toomey, N.L., and Lee, M.Y. (1997). Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Res* 25, 5041-5046.
- Magdalou, I., Lopez, B.S., Pasero, P., and Lambert, S.A. (2014). The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Seminars in cell & developmental biology* 30, 154-164.
- Maya-Mendoza, A., Petermann, E., Gillespie, D.A., Caldecott, K.W., and Jackson, D.A. (2007). Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *EMBO J* 26, 2719-2731.
- Michalet, X., Ekong, R., Fougereuse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., van Slegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J.S., et al. (1997). Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 277, 1518-1523.
- Nagano, T., Hashimoto, T., Nakashima, A., Hisanaga, S., Kikkawa, U., and Kamada, S. (2013). Cyclin I is involved in the regulation of cell cycle progression. *Cell Cycle* 12, 2617-2624.
- Niu, H., Erdjument-Bromage, H., Pan, Z.Q., Lee, S.H., Tempst, P., and Hurwitz, J. (1997). Mapping of amino acid residues in the p34 subunit of human single-stranded DNA-binding protein phosphorylated by DNA-dependent protein kinase and Cdc2 kinase in vitro. *J Biol Chem* 272, 12634-12641.
- Oakley, G.G., and Patrick, S.M. (2010). Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 15, 883-900.
- Olson, E., Nievera, C.J., Klimovich, V., Fanning, E., and Wu, X. (2006). RPA2 is a direct downstream target for ATR to regulate the S-phase checkpoint. *J Biol Chem* 281, 39517-39533.
- Patrick, S.M., Oakley, G.G., Dixon, K., and Turchi, J.J. (2005). DNA damage induced hyperphosphorylation of replication protein A. 2. Characterization of DNA binding activity, protein interactions, and activity in DNA replication and repair. *Biochemistry* 44, 8438-8448.
- Paulsen, R.D., and Cimprich, K.A. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst)* 6, 953-966.
- Petermann, E., and Helleday, T. (2010). Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 683-687.

- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Molecular Cell* 37, 492-502.
- Peto, R., Pike, M.C., Armitage, P., Breslow, N.E., Cox, D.R., Howard, S.V., Mantel, N., McPherson, K., Peto, J., and Smith, P.G. (1977). Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. analysis and examples. *British journal of cancer* 35, 1-39.
- Rimmele, P., Komatsu, J., Hupe, P., Roulin, C., Barillot, E., Dutreix, M., Conseiller, E., Bensimon, A., Moreau-Gachelin, F., and Guillouf, C. (2010). Spi-1/PU.1 oncogene accelerates DNA replication fork elongation and promotes genetic instability in the absence of DNA breakage. *Cancer Res* 70, 6757-6766.
- Shi, W., Feng, Z., Zhang, J., Gonzalez-Suarez, I., Vanderwaal, R.P., Wu, X., Powell, S.N., Roti, J.L.R., Gonzalo, S., and Zhang, J. (2010). The role of RPA2 phosphorylation in homologous recombination in response to replication arrest. *Carcinogenesis* 31, 994-1002.
- Sleeth, K.M., Sorensen, C.S., Issaeva, N., Dziegielewska, J., Bartek, J., and Helleday, T. (2007). RPA mediates recombination repair during replication stress and is displaced from DNA by checkpoint signalling in human cells. *J Mol Biol* 373, 38-47.
- Strock, C.J., Park, J.I., Nakakura, E.K., Bova, G.S., Isaacs, J.T., Ball, D.W., and Nelkin, B.D. (2006). Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res* 66, 7509-7515.
- Tian, B., Yang, Q., and Mao, Z. (2009). Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death. *Nat Cell Biol* 11, 211-218.
- Tourriere, H., and Pasero, P. (2007). Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA Repair (Amst)* 6, 900-913.
- Treuner, K., Findeisen, M., Strausfeld, U., and Knippers, R. (1999). Phosphorylation of replication protein A middle subunit (RPA32) leads to a disassembly of the RPA heterotrimer. *J Biol Chem* 274, 15556-15561.
- Turner, N.C., Lord, C.J., Iorns, E., Brough, R., Swift, S., Elliott, R., Rayter, S., Tutt, A.N., and Ashworth, A. (2008). A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *EMBO J* 27, 1368-1377.
- Upadhyay, A.K., Ajay, A.K., Singh, S., and Bhat, M.K. (2008). Cell cycle regulatory protein 5 (Cdk5) is a novel downstream target of ERK in carboplatin induced death of breast cancer cells. *Current cancer drug targets* 8, 741-752.
- Vassin, V.M., Anantha, R.W., Sokolova, E., Kanner, S., and Borowiec, J.A. (2009). Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. *J Cell Sci* 122, 4070-4080.
- Wu, X., Yang, Z., Liu, Y., and Zou, Y. (2005). Preferential localization of hyperphosphorylated replication protein A to double-strand break repair and checkpoint complexes upon DNA damage. *Biochem J* 391, 473-480.
- Xie, Z., Samuels, B.A., and Tsai, L.H. (2006). Cyclin-dependent kinase 5 permits efficient cytoskeletal remodeling--a hypothesis on neuronal migration. *Cerebral cortex* 16 Suppl 1, i64-68.
- Xu, S., Li, X., Gong, Z., Wang, W., Li, Y., Nair, B.C., Piao, H., Yang, K., Wu, G., and Chen, J. (2014). Proteomic Analysis of the Human CDK Family Reveals a Novel CDK5 Complex Involved in Cell Growth and Migration. *Molecular & cellular proteomics : MCP*.
- Xu, X., Vaithiyalingam, S., Glick, G.G., Mordes, D.A., Chazin, W.J., and Cortez, D. (2008). The basic cleft of RPA70N binds multiple checkpoint proteins, including RAD9, to regulate ATR signaling. *Mol Cell Biol* 28, 7345-7353.

Figures :

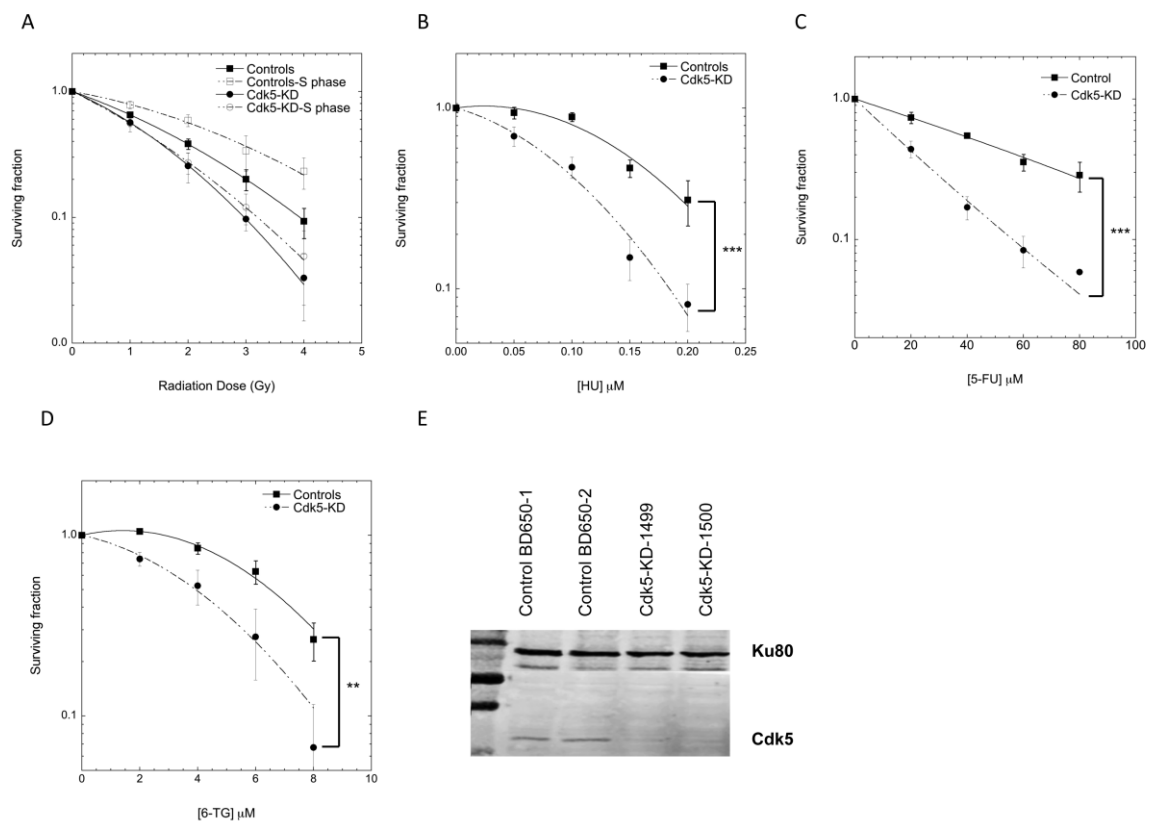


Fig 1: Clonogenic cell survival of Control and Cdk5 deficient cell lines to increasing doses of (A) ^{137}Cs gamma rays (B) Hydroxyurea (HU) (C) 5-fluorouracil (5-FU) and (D) 6-thioguanine (6-TG)

(A) Asynchronous or synchronized in S-phase (double thymidine block) cells were irradiated and colonies were allowed to grow for 10-15 days. **(B)** Asynchronous cells were exposed to increasing concentrations of HU present in the culture medium until colony fixation or to **(C)** 5-FU or **(D)** 6-TG for 24 h followed by fresh medium and colony growth. Data represents mean \pm SD from at least two independent experiments using 2 different HeLa Cdk5 clones in triplicate for all conditions. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Unpaired t-test). **(E)** Representative western blot showing the depletion of Cdk5 protein in Cdk5-KD cell lines. Ku80 was used as a gel loading control.

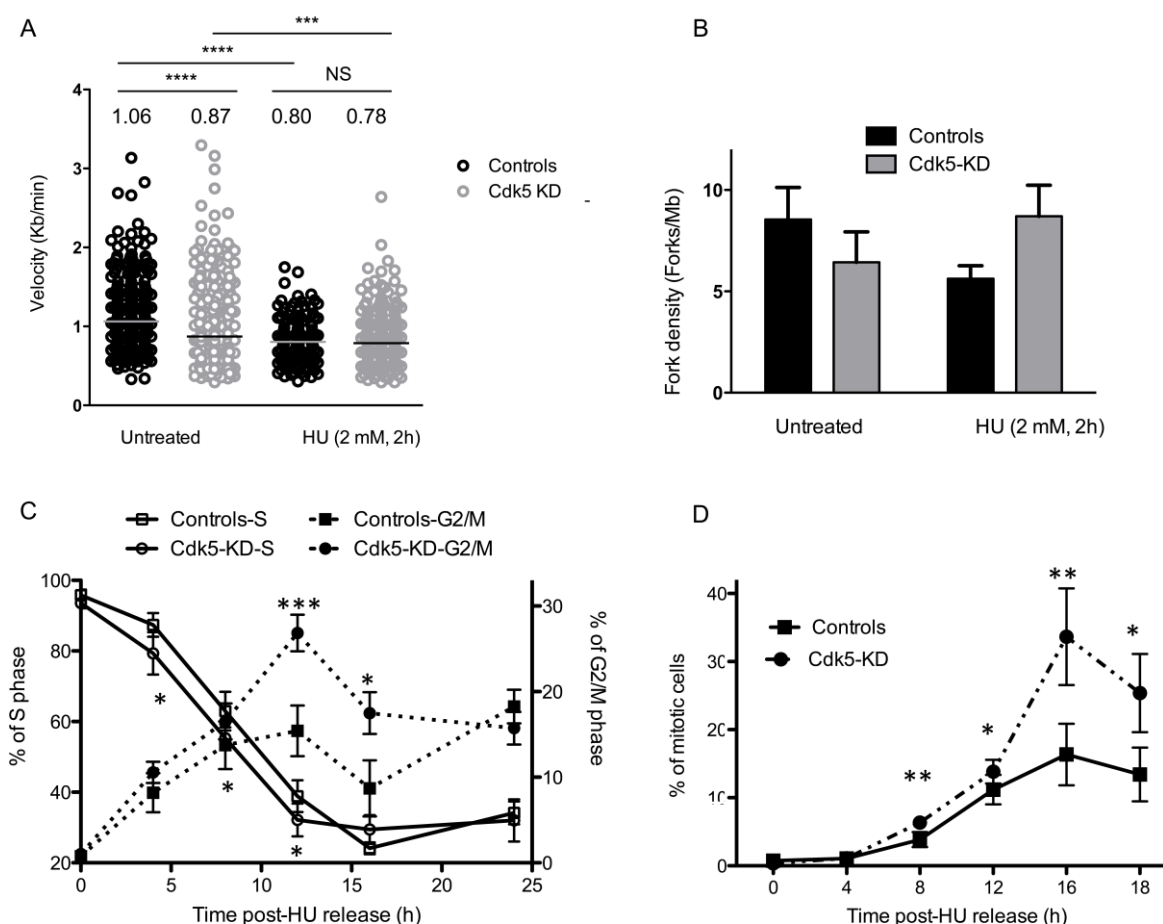


Fig 2: Cdk5-KD cells show a faster progression through S and G2 after exposure to HU

(A) Replication fork speed distribution in Control and Cdk5-KD cells in treated (HU 2mM, 2 h) or untreated cells. 100 to 250 DNA fibers were scored per condition. The numbers correspond to the median (shown as a horizontal line) replication speed. *P* values are indicated (NS - not significant; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001, Mann-Whitney test). Data are based on two independent experiments for 2 different HeLa Cdk5 clones. **(B)** Increased fork density in Cdk5-KD cells after HU (2 mM, 2 h) treatment: Control and Cdk5-KD cell lines were treated or not, then labeled with successive pulses of IdU and CldU for 30 min each. Fork density was determined as the number of forks per Mb in the S-phase DNA population. More than 100 Mb was measured per condition. Data are means \pm SD from 2 independent experiments for 2 different HeLa Cdk5 clones. **(C)** Cells were treated with HU (2mM) for 24 h, released into fresh medium (0h corresponds to 24 h HU treatment) then pulse labeled with BrdU (10 μ M, 15 min) at different times post release before collection and the percentage of Controls and Cdk5-KD cells in S and G2/M phases were determined by FACS analysis. Data are means \pm SD from 3 independent experiments for 2 different HeLa Cdk5 clones. (* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001; Unpaired t-test). **(D)** Mitotic entry after HU release. Control and Cdk5 cells were treated with 2 mM HU for 24 h and released into medium containing Nocodazole (50 μ g/ μ l). The percentage of mitotic cells was analyzed by FACS by phospho-H3 content. Data are means \pm SD from 2 independent experiments for 2 different HeLa Cdk5 clones. (* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001; Unpaired t-test).

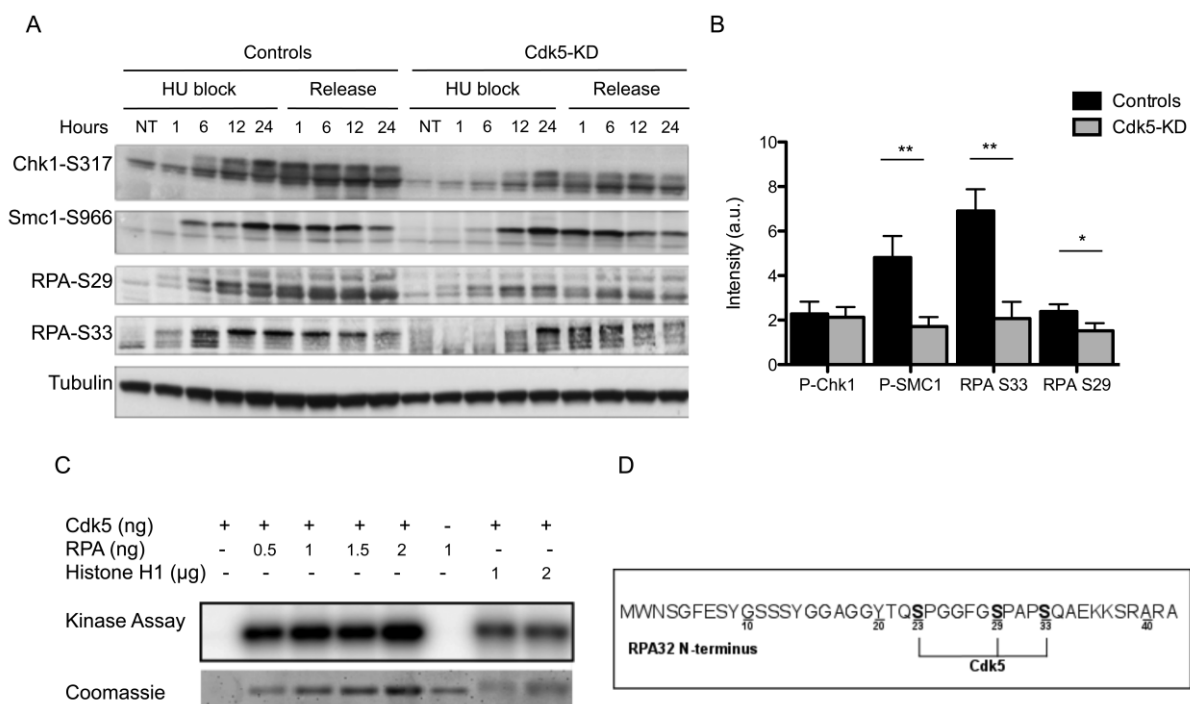


Fig 3: Decreased ATR and Cdk5-dependent phosphorylation of Replication Protein A upon HU treatment in Cdk5 depleted cells

(A) Representative western blot analysis of phospho-SMC1-S966, phospho-Chk1-S317 and phospho-RPA-S29 and S33 in protein extracts from Control and Cdk5-KD cells during a 24 h HU block (2mM) and over the following 24 h after release from the block. Total Tubulin was used as a loading control.

(B) Quantification data are ratios of intensities of treated to non-treated cellular extracts after normalization with tubulin intensity, data are means \pm SD from 2-3 independent experiments using 2 different HeLa Cdk5 clones. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Unpaired t-test).

(C) *In vitro* kinase assay showing the phosphorylation of purified RPA32 protein by Cdk5/p25 recombinant kinase after 30 min at 25° C. The image is representative of three independent experiments. The phosphorylation of histone H1 by Cdk5 was used as a positive control.

(D) Sites of phosphorylation of the RPA protein by Cdk5 *in vitro* (same experimental settings as in 3C), identified by mass spectrometry: S23, S29 and S33. All three sites were detected in seven independent experiments (full spectra are shown in **Figure S3**).

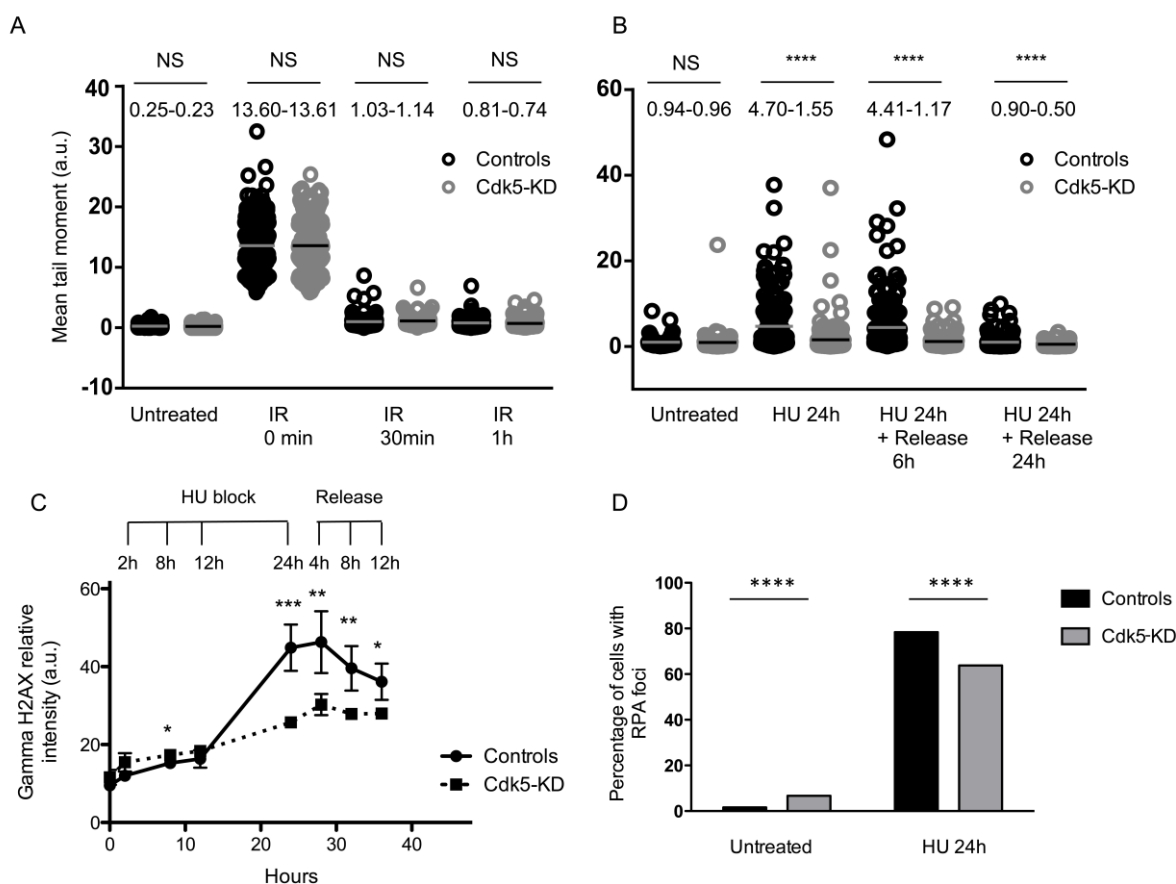


Fig 4: Compromised Cdk5 expression impacts on the processing of DNA DSBs

DNA strand break formation and persistence measurement in the Cdk5-KD and Control cells using the alkaline Comet assay (**A**) 30 min and 1 h after exposure to gamma-irradiation (8 Gy) or (**B**) 24 h after treatment with HU (2 mM). Cells were either grown on coverslips, treated *in situ* with 2 mM HU, collected by trypsinization, suspended in 0.5% low melting point agarose and transferred onto a microscope slide precoated with agarose or treated directly with gamma-radiation on the agarose slides. The data correspond to the mean tail moment. Mean values are represented as horizontal lines. 200 cells for 2 different HeLa Cdk5 clones were scored per condition. *P* values are indicated (NS - not significant; **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; *****P*<0.0001) using unpaired t-test. (**C**) The induction of gamma H2AX was assessed using immune-coupled FACS analysis to quantify total gamma H2AX levels using fluorescence intensity in the cells as a read-out: Cells were collected at the times indicated during HU treatment (2 mM) and after 24h of treatment when cells were released into a fresh medium containing nocodazole (50 µg/µl). Mean and SD values are presented from three independent experiments using 2 different HeLa Cdk5 clones analyzed using an unpaired t-test. (**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001). (**D**) Decreased number of cells with RPA foci in Cdk5-KD cells after HU treatment: Cells were released from HU treatment (24 h, 2 mM), fixed and immunostained for RPA 32 and the number of RPA foci analyzed using a 2D Spinning-Disc/Tirf/Frap system. Data are the percentage of cells with more than 5 foci (median ± SE), from 3 independent experiments with a minimum of 300 cells analyzed per experiment. Statistical analysis was carried using an unpaired t-test (*****P*<0.0001).

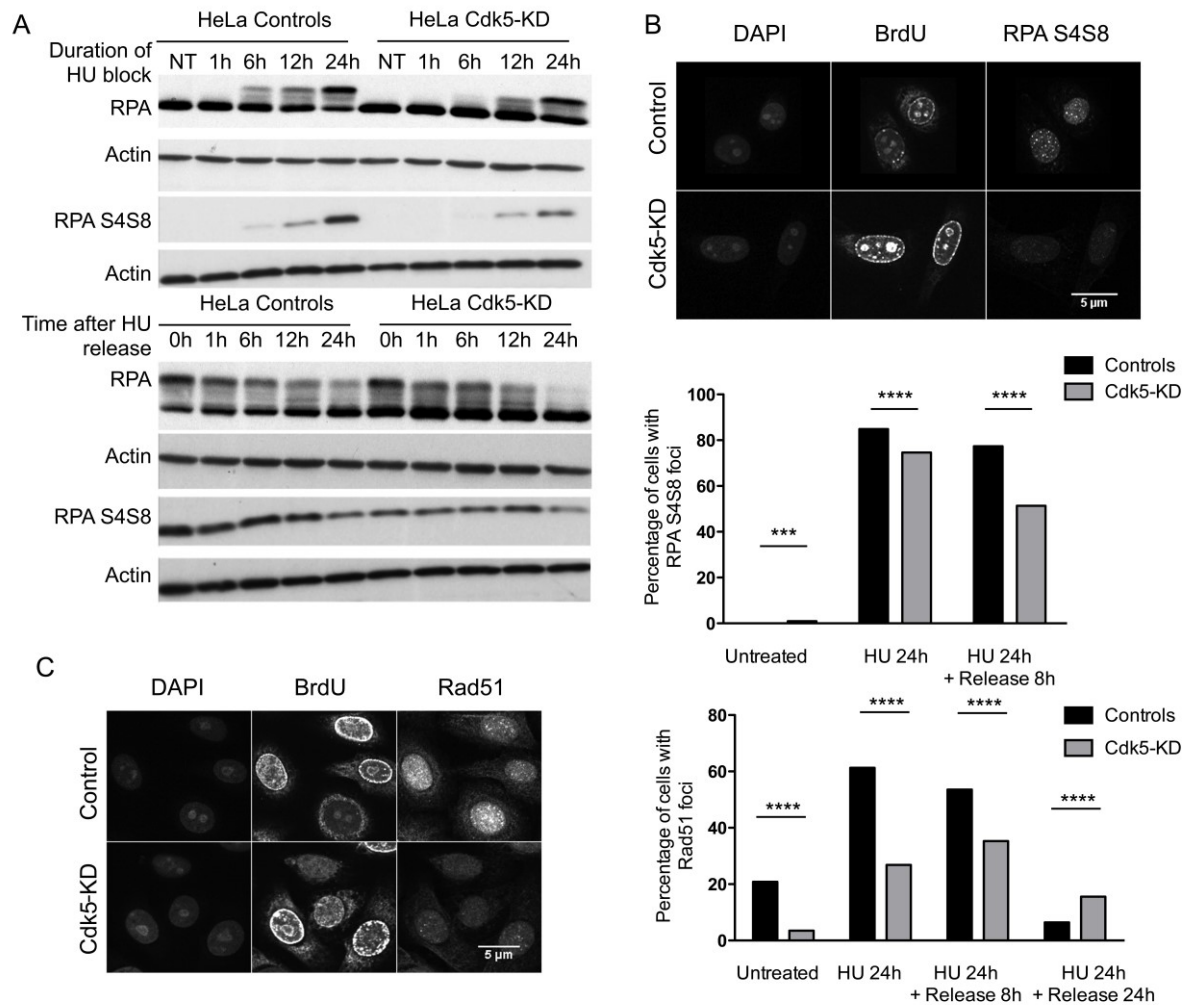


Fig 5: Lower RPA S4S8 phosphorylation and Rad51 foci formation in Cdk5-KD cells after HU treatment

(A) Representative western blot of phospho-RPA S4S8 levels in protein extracts from Control and Cdk5-KD during HU block (2 mM, 24 h of treatment) and up to 24 h after its removal from the culture medium. RPA S4S8 was detected using a phosphospecific antibody. Actin expression was used as a gel loading control.

(B) Phospho-RPA foci formation: Cells were released from HU (2 mM, 24 h) at the indicated times, fixed and immunostained for RPA S4S8. The number of foci/cell was quantitated using a 2D Spinning-Disc/Tirf/Frap system. The figures are representative of 2 independent experiments with the mean percentage of cells carrying more than 5 foci presented, with SEM. Only BrdU positive cells (S-phase) were quantified with 350 to 600 cells analyzed (**** $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, unpaired t-test).

(C) Formation and persistence of RAD51 foci in Cdk5-KD and Control cells: cells were treated or not with HU (2 mM, 24 h) and Rad51 foci quantified using a 2D Spinning-Disc/Tirf/Frap system after a pulse labeling with BrdU (10 μ M, 15 min) at the indicated times. Data are representative of four independent experiments using two different Cdk5-KD clones with between 600 and 3,000 cells analyzed for each condition and represent the number of BrdU positive cells carrying more than 5 foci, compared by t-test between the different treatment groups (*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

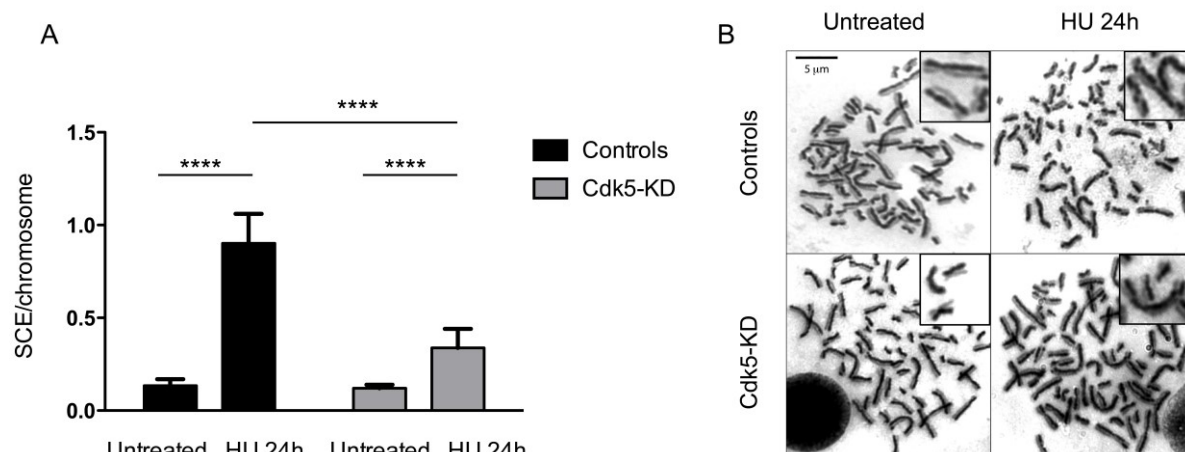


Fig 6: Level of HU-induced SCEs is lower in Cdk5-KD cells compared to Control cells:

(A) Number of SCEs per chromosome in untreated or HU treated (2 mM HU, 24 h) Control or Cdk5-KD cells (2 different clones). Between 2372 and 4499 chromosomes from 3 independent experiments were analyzed for each condition. Error bars represent standard errors of the means. (**** $P < 0.0001$, unpaired t-test).

(B) Representative images of SCE in Control and Cdk5-KD cells, without and after HU treatment (2 mM, 24h) Chromosomes were observed with a Leica DMRB microscope at 100x magnification.

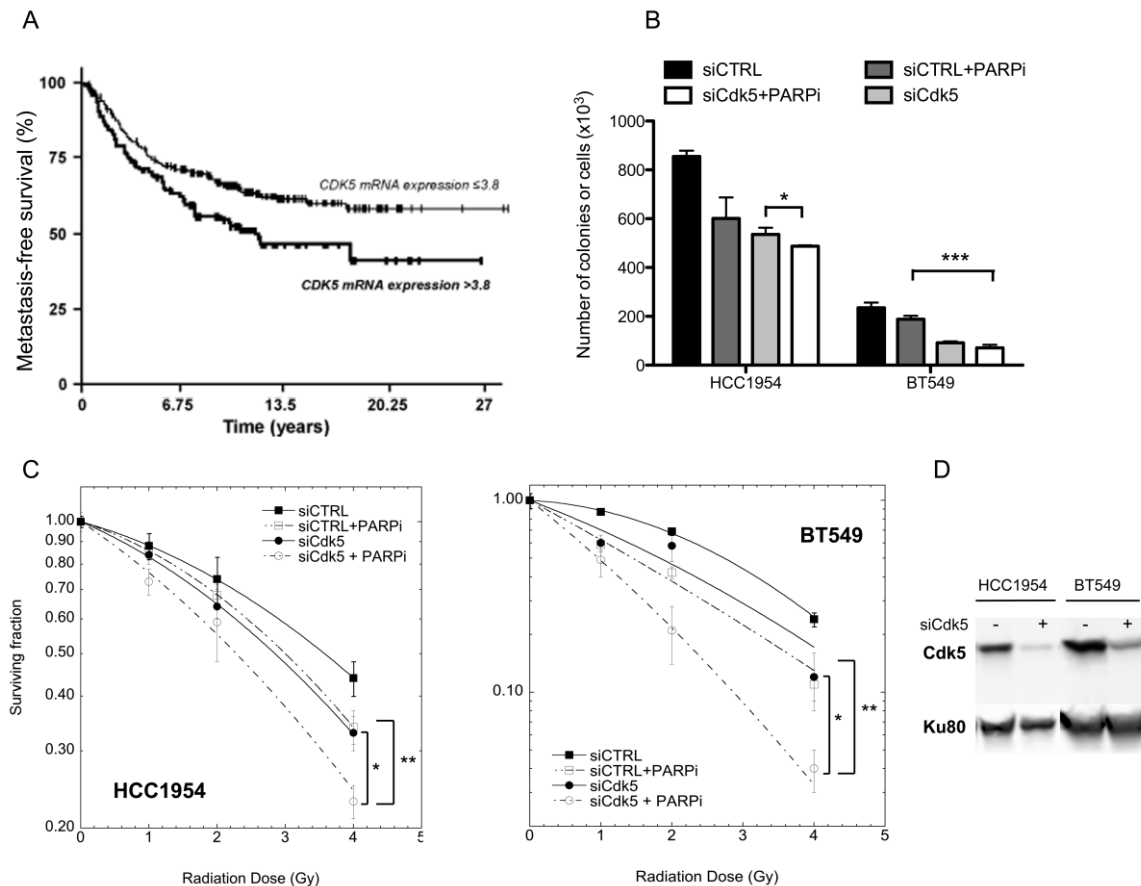


Fig 7: Survival of patients with breast tumours and breast cancer lines depending on *Cdk5* expression profile

(A) MFS curves for breast tumor patients with high ($NCdk5 > 3.8$) and low ($NCdk5 \leq 3.8$) tumor expression levels of *Cdk5* mRNA. The mean patient follow-up was 9.5 years (range 5 months to 33 years) and 169 patients in the cohort developed metastases.

(B) Survival of HCC1954 and BT549 breast tumour cell lines. Cells were transfected either with a siRNA control or a siRNA directed against *Cdk5* expression. 72 h later they were plated and left to attach for 4h before treatment with or without the PARP inhibitor ABT888 ($10 \mu\text{M}$). 24 h after treatment cell culture medium was changed and colonies grown for 8 days and counted. Data are the mean numbers of colonies counted \pm SD from two independent experiments each in triplicate (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, unpaired t-test).

(C) Clonogenic cell survival of HCC1954 (left panel) and BT549 (right panel) breast tumour cells depending on *Cdk5* expression after increasing doses of gamma-irradiation in the presence or not of a PARP inhibitor. Cells were transfected with either a control or *Cdk5* siRNA as in panel (B) and then the PARP inhibitor ABT888 ($10 \mu\text{M}$) added 1h prior to radiation. 24 h after treatment cell culture medium was changed and colonies grown for 8 days and counted. Data are the mean survivals of two independent experiments each in triplicate (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, unpaired t-test).

(D) Representative western blot of breast cancer cell lines after transfection with siControl or siCdk5.

2. Supplementary materials and figures

Cdk5 promotes DNA replication stress checkpoint activation through RPA32 phosphorylation, and impacts on metastasis free survival in breast cancer patients

Sara Chiker^{1,2,3}, Vincent Pennaneach^{1,2}, Damarys Loew⁴, Florent Dingli⁴, Denis Biard⁵, Fabrice P. Cordelières^{1,6,7***}, Sophie Vacher⁸, Ivan Bieche⁸, Janet Hall^{1,2*} and Marie Fernet^{1,2}

Supplementary Experimental Procedures

Mass Spectrometry Analyses

After incubation of RPA32 with Cdk5, proteins were separated on SDS–PAGE gels stained with LabSafe GEL Blue Stain (G-Biosciences) and the RPA bands excised. Gel slices were washed and proteins reduced with 10 mM dithiothreitol prior to alkylation with 55 mM iodoacetamide. After washing and shrinking the gel pieces with 100% acetonitrile (MeCN), an in-gel digestion was performed using trypsin (Promega) and adding Chymotrypsin (Sequencing Grade, Promega) after 1 h in 25 mM NH_4HCO_3 at 37°C and continuing the digest for another 4 additional hours. The extracted peptides were analysed by nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry using an Ultimate 3000 system (Dionex S.A.) coupled to an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Samples were loaded onto a C18 precolumn (300 μm inner diameter x 5 mm; Dionex) at 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ in 2% MeCN, 0.1% trifluoroacetic acid. After 3 min of desalting, the precolumn was switched with the analytical C18 column (75 μm i.d. x 50 cm, packed with C18 PepMap™, 3 μm , 100 Å; LC Packings) equilibrated in solvent A (2% MeCN, 0.1% HCO_2H). Bound peptides were eluted using a two-step linear gradient of 157 min (from 0 to 30%) and 20 min (from 30 to 50%) of solvent B (80% MeCN, 0.085% HCO_2H) at a 150 nl/min flow rate and an oven temperature of 40°C. A LTQ-Orbitrap mass spectrometer was used in the positive ion mode and Survey MS scans acquired in the Orbitrap on the 350–1000 m/z range with the resolution set to a value of 100,000. We recalibrated each scan in real time by co-injecting an internal standard from ambient air into the C-trap. We selected the five most intense ions per survey scan for collision induced fragmentation and analyzed the resulting fragments in the linear trap (LTQ) and, if a neutral loss of 98 Da from the precursor ion was observed, then we enabled a multistage activation (MSA). Target ions already selected for MS/MS were dynamically excluded for 30 s. We acquired data using the Xcalibur software (v 2.2) and the resulting spectra were interrogated by Mascot™ and SEQUEST® through Proteome Discoverer (v 1.4, Thermo Scientific) with the SwissProt Homo sapiens database. We set carbamidomethylation of Cys, oxidation of Met, N-terminal acetylation, phosphorylation of Ser and phosphorylation of Thr as variable modifications for all searches. We set specificity of trypsin and chymotrypsin digestion and allowed two missed cleavage sites and we set the mass tolerances in MS and MS/MS to 2 ppm and 0.5 Da, respectively. The resulting Mascot and Sequest files were further processed using myProMS¹. We validated phosphorylated peptides by combining phosphoRS analysis and by manually inspecting the peak assignment. The procedure was used to analyse the phosphorylation of RPA32 by Cdk1 and Cdk2.

Label-free Quantification

To quantify the phosphorylated peptides, we extracted from the MS survey of nano-LC-MS/MS raw files the extracted ion chromatogram (XIC) signal of the well characterized tryptic peptide ions using the Pinpoint™ (version: 1.2, Thermo Scientific) software. We integrated XIC areas in Xcalibur under the QualBrowser interface using the ICIS algorithm. We calculated Mean values of normalized areas by using the total RPA 32 kDa signal (all RPA 32 kDa peptide ions). We calculated mean values and S.D. for four replicate measurements of independent experiments.

Supplemental Table 1: Characteristics of the 456 breast cancer relative to mRNA over-expression of Cdk5

	Total population (%)	Number of patients (%)		<i>p</i> ^a
		CdK5 mRNA expression ≤3.8 relative to normals	CdK5 mRNA expression >3.8 relative to normals	
<i>Total</i>	456 (100.0)	322 (70.6)	134 (29.4)	
<i>Age</i>				
≤50	98 (21.5)	65 (66.3)	33 (33.7)	0.29 (NS)
>50	358 (78.5)	257 (71.8)	101 (28.2)	
<i>SBR histological grade</i> ^{b,c}				
I	58 (13)	45 (77.6)	13 (22.4)	0.21 (NS)
II	229 (51.2)	165 (72.1)	64 (27.9)	
III	160 (35.8)	106 (66.3)	54 (33.8)	
<i>Lymph node status</i> ^d				
0	119 (26.1)	73 (61.3)	46 (38.7)	0.024
1-3	237 (52.1)	173 (73.0)	64 (27.0)	
>3	99 (21.8)	76 (76.8)	23 (23.2)	
<i>Macroscopic tumor size</i> ^e				
≤25mm	223 (49.8)	167 (74.9)	56 (25.1)	0.070 (NS)
>25mm	225 (50.2)	151 (67.1)	74 (32.9)	
<i>ERα status</i> *				
Negative	118 (25.9)	79 (66.9)	39 (33.1)	0.31 (NS)
Positive	338 (74.1)	243 (71.9)	95 (28.1)	
<i>PR status</i> *				
Negative	194 (42.5)	130 (67.0)	64 (33.0)	0.15 (NS)
Positive	262 (57.5)	192 (73.3)	70 (26.7)	
<i>ERBB2 status</i> *				
Negative	357 (78.3)	261 (73.1)	96 (26.9)	0.026
Positive	99 (21.7)	61 (61.6)	38 (38.4)	
<i>Molecular subtypes</i>				
RH- ERBB2-	68 (14.9)	44 (64.7)	24 (35.3)	0.032
RH- ERBB2+	45 (9.9)	30 (66.7)	15 (33.3)	
RH+ ERBB2-	289 (63.4)	217 (75.1)	72 (24.9)	
RH+ ERBB2+	54 (11.8)	31 (57.4)	23 (42.6)	
<i>KI67 mRNA expression median</i>	12.5 (0.80-117)	11.5 (0.85-77.8)	17.2 (0.80-117)	0.00000011 ^f
<i>Relapse</i>				
No	287 (62.9)	213 (74.2)	74 (25.8)	0.028
Yes	169 (37.1)	109 (64.5)	60 (35.5)	

a χ^2 Test, b Scarff Bloom Richardson classification, c Information available for 447 patients, d Information available for 455 patients, e Information available for 448 patients, f Kruskal Wallis's H test, NS: non-significant, * Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and ERBB2 status was determined at the protein level by biochemical methods (dextran-

coated charcoal method, enzymatic immuno-assay or immunohistochemistry) at the time of surgery and confirmed by ER α , PR and ERBB2 real-time qRT-PCR assays^{2,3}.

Supplemental Table 2: Primers and RT-qPCR conditions and siRNAs

Sequences for siRNA

Cdk5

5' CAACAUCCCUUGGUGAACGUTT 3'

3' TTGUUGUAGGGACACUUGCA 5'

Sequences for primers RTqPCR

Cdk5 - U: 5'-CAAGCTGCCAGACTATAAGCCCTA-3'

Cdk5 - L: 5'-TGCAGCAGATCCCTCCCTGT-3'

TBP - U: 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'

TBP - L: 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'

PCR conditions

95°C 10 min ; (95°C 15 sec 65°C 1 min) 50 cycles.

Supplemental Table 3 : Details of antibodies used

Antibody	Supplier
Cdk5 (Py15)	Epitomics (1947-S)
RPA 34 (9H8)	Pierce (MA1-26418)
p.RPA S33	Bethyl (A300-246A)
p.RPA S4S8	Bethyl (A300-245A)
p.Chk1 317	Bethyl (A300-163A)
Rad51 (H-92)	Santa Cruz (SC-8349)
H2AX (Ser139) FITC conjugated	Euromedex (16-202A)
p.SMC1 S966	Bethyl (A300-050A)
ssDNA	Milipore (MAB3034)
BrdU (Monoclonal Antibody) Rat Clone: BU1/75	Ab Serotec (OBT0030)
Anti-BrdU FITC (clone B44)	BD Bioscience (347583)

Figure S1

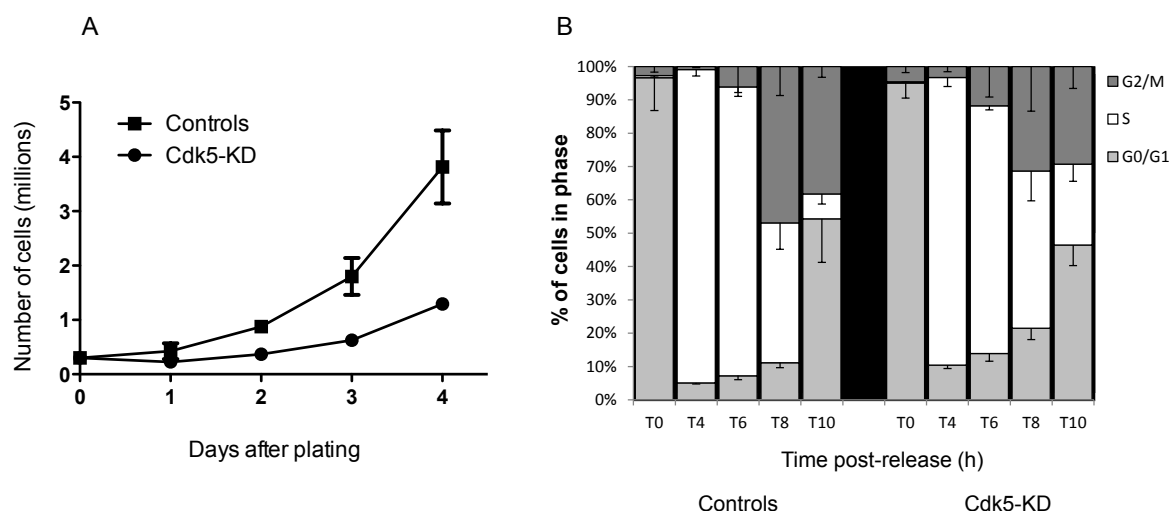


Fig S1: Reduced S-phase dynamics in the absence of the Cdk5 protein

(A) Proliferation curves of Control and Cdk5-KD cells growing under normal growth conditions. $3 \cdot 10^5$ cells were plated in 25 cm^2 flasks and 3 flasks per time point were counted at the indicated times.

(B) In order to determine the cell cycle progression and the length of S phase, cells were synchronized by a double thymidine block then pulsed labeled with BrdU ($10 \mu\text{M}/15 \text{ min}$) and analyzed by FACS at the indicated times. Data are mean \pm SD from 3 independent experiments.

Figure S2

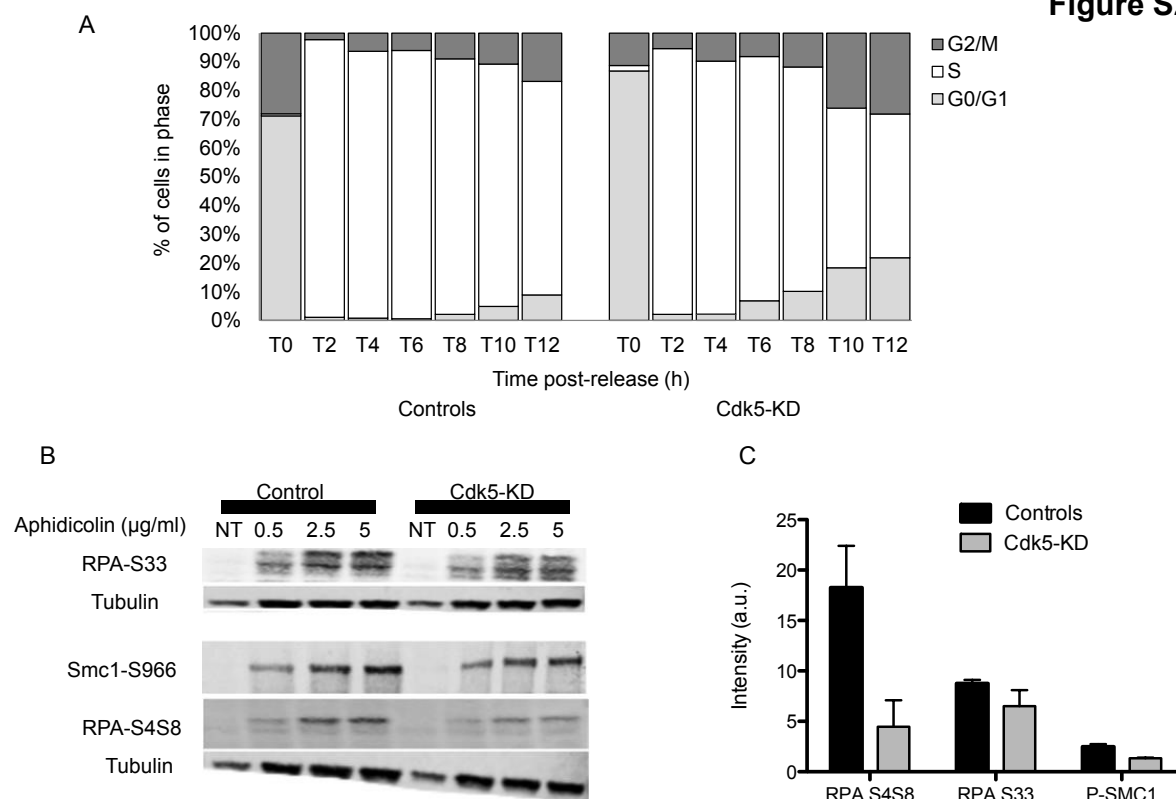


Fig S2: Cdk5-KD cells show a faster progression through S and G2 after exposure to Aphidicolin and reduced phosphorylation of RPA32 S33 and S4S8

(A) Cells were treated with Aphidicolin (4µg/ml) (Sigma) for 24 h, released into fresh medium (0 h corresponds to 24 h of Aphidicolin treatment) then pulse labeled with BrdU (10 µM, 15 min) at different times post-release before collection. The percentage of Control and Cdk5-KD cells in G1, S and G2/M phases were determined by FACS analysis. Data presented is from one experiment.

(B) Representative western blot analysis of phospho-SMC1 (S966), and phospho-RPA32 S4S8 and S33 in protein extracts from Control and Cdk5-KD cells treated for 24 h with 0.5/2.5/5 µg/ml of Aphidicolin. Total Tubulin was used as a loading control.

(C) Quantification data are ratios of intensities from treated (24 h /2.5 µg/ml) vs non-treated cellular extracts, data are means ± SD from 2 independent experiments

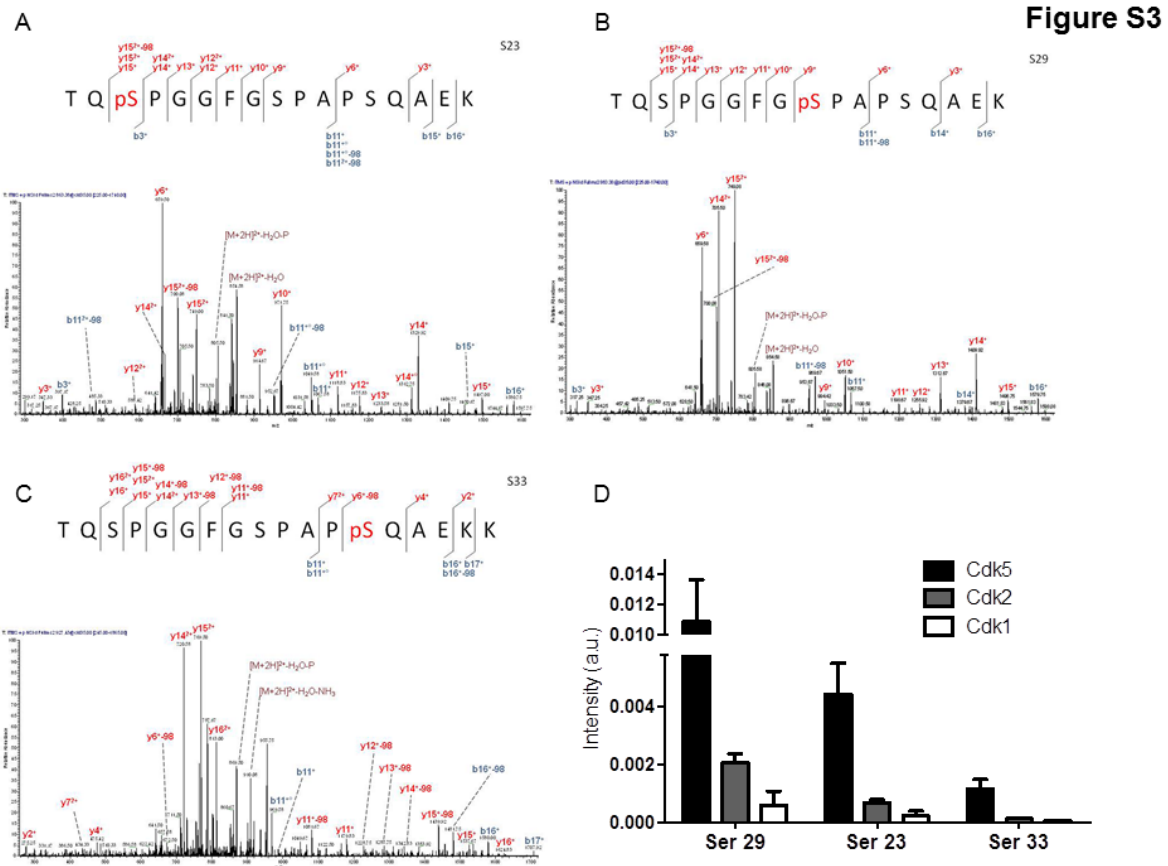


Fig S3: Identification of RPA phosphorylation sites by mass spectrometry

Liquid chromatography-MS/MS spectra (MSA enabled) of RPA32 phosphopeptides containing (A) Ser23 (TQpSPGGFGSPAPSQAEEK: $863.38^{(2+)} m/z$), (B) Ser29 (TQSPGGFGpSPAPSQAEEK: $863.38^{(2+)} m/z$) and (C) Ser33 (TQSPGGFGSPAPpSQAEEKK: $927.43^{(2+)} m/z$). The fragmentation spectra are trypsin/chymotrypsin derived peptides and show the peptide sequence based on the interpretation of the observed ions obtained. Tandem mass spectrum were labeled to show singly and doubly charged *b* and *y* ions, as well as ions corresponding to neutral losses of water (H_2O , circles °) and H_3PO_4 (*P*, 98 Da) groups; *M*: parent ion mass are shown.

(D) Quantification of the phosphorylation of RPA32 at positions Ser29, Ser23 and Ser33. The bar charts represent the relative phosphorylation intensity of RPA32 by Cdk5, Cdk2 and Cdk1. Data are means \pm SD from four independent experiments.

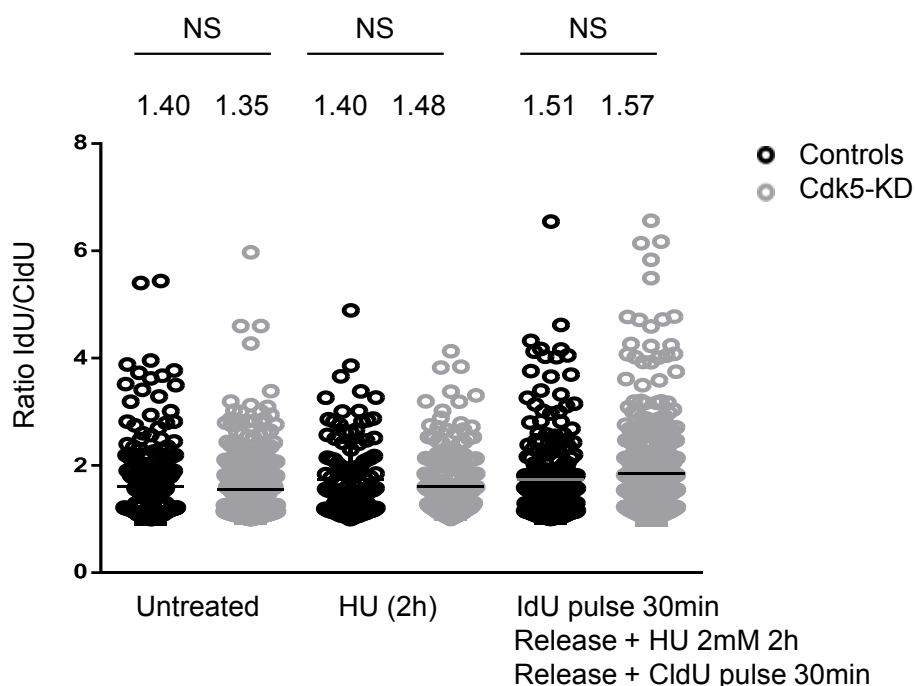


Fig S4: Distribution of asymmetric replication bubbles in Control and Cdk5-KD cells

The ratio of IdU/CldU was calculated for each replication fork. Distribution of ratios was analyzed as described previously⁴ with no significant difference observed between the cells lines.

References:

- 1 Pouillet P, Carpentier S, Barillot E. myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics* 2007; 7: 2553-2556.
- 2 Bieche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R *et al.* Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clinical chemistry* 1999; 45: 1148-1156.
- 3 Bieche I, Parfait B, Le Doussal V, Olivi M, Rio MC, Lidereau R *et al.* Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. *Cancer Res* 2001; 61: 1652-1658.
- 4 Techer H, Koundrioukoff S, Azar D, Wilhelm T, Carignon S, Brison O *et al.* Replication dynamics: biases and robustness of DNA fiber analysis. *J Mol Biol* 2013; 425: 4845-4855.

En conclusion l'ensemble de ces résultats montre que :

- Cdk5 régule positivement la réplication au cours de la progression normale en phase S, elle promeut la réplication et plus particulièrement l'activation des fourches de réplication,
- Cdk5 est requise pour la signalisation des dommages de l'ADN en réponse au stress réplcatif,
- Cdk5 est requise pour l'activation du point de contrôle en phase S, afin de réduire la vitesse de réplication en présence de stress réplcatif et de réprimer les origines tardives. D'un point de vue moléculaire, cette observation est due à l'importance de la kinase Cdk5 pour une phosphorylation optimale de la cascade de signalisation induite par ATR.
- La protéine RPA32 est un substrat direct de la kinase Cdk5,
- L'absence de Cdk5 génère une réduction de la réparation par RH mesurée par les foyers RPA S4S8, Rad51 et les SCEs apres traitement au HU.
- En absence de Cdk5, moins d'ADN simple brin est généré en réponse au HU,
- Une faible expression de Cdk5 est associée à une meilleure survie sans métastases de patientes atteintes d'un cancer du sein (montré par l'analyse de l'expression de Cdk5 dans les tumeurs).

Basé sur nos résultats, deux modèles peuvent être proposés pour le role de CDK5(Figure 26) :

1)- La phosphorylation par Cdk5 de RPA sur les serines S23, S29 et S33, est nécessaire pour les phosphorylations en *trans* de RPA par ATR et permet une hyperphosphorylation DNA-PK dépendante sur S4/8. L'hyperphosphorylation de RPA est nécessaire à l'activation du point de contrôle intra-S et l'initiation des évènements de résection nécessaire au HR.

2)- Cdk5, par un mécanisme qui reste encore à identifier, promeut le découplage hélicase/polymérase et permet l'accumulation d'ADN simple brin nécessaire au déclenchement de la cascade de signalisation ATR dépendante.

Nous développerons dans la partie perspective, les expériences nécessaires afin de continuer ce travail.

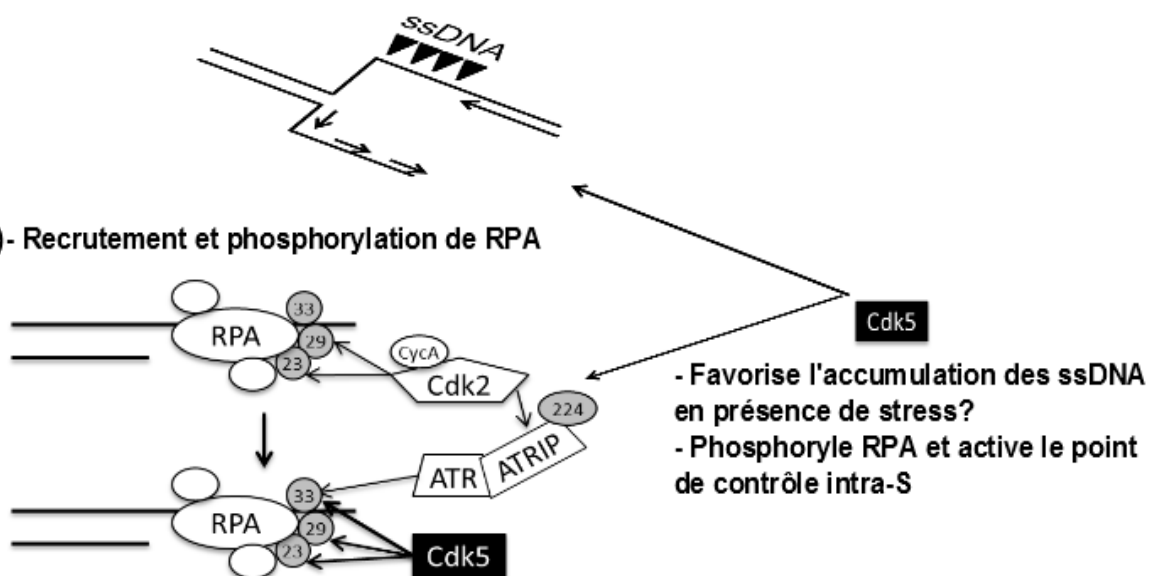
Not clear whether the two are mutually exclusive or not

1)- Induction de stress Réplicatif

2)- Découplage du complexe Helicase/Polymérase

3)- Accumulation de région simple brins et/ou CDB sur les régions non protégées

4)- Recrutement et phosphorylation de RPA



5)- Hyperphosphorylation de RPA



Accumulation de Rad51 et initiation de la RH
Activation du point de contrôle intra-S

Figure 26: Modèle représentatif des modes d'actions de Cdk5 au niveau de la fourche de réplication

3. Résultats complémentaires

Comme je l'ai précédemment abordé, le point de départ de ma thèse était basé sur les résultats obtenus par Turner et al. (Turner et al., 2008) qui avaient démontré un effet additif de l'inhibition de la protéine Cdk5 et des inhibiteurs de PARP. Leurs observations, ainsi que l'ensemble du travail de Bolin et al. (Bolin et al., 2012) suggèrent que l'inhibition de Cdk5 modifie la réponse aux radiations ionisantes. Les résultats ci-dessous décrivent les travaux réalisés sur des lignées HeLa déplétées pour Cdk5 afin de déterminer l'implication de cette protéine dans le contrôle du cycle cellulaire, la signalisation des dommages ainsi que la réparation.

3.1 Caractérisation des clones HeLa Contrôles et Cdk5 KD

J'ai tout d'abord caractérisé notre modèle cellulaire HeLa en termes d'expression des protéines majeures de la réponse aux dommages. La Figure 26 montre une extinction totale de l'expression de Cdk5 dans les 2 clones Cdk5 KD et une expression des protéines clés de la signalisation et réparation similaire dans nos quatre clones HeLa.

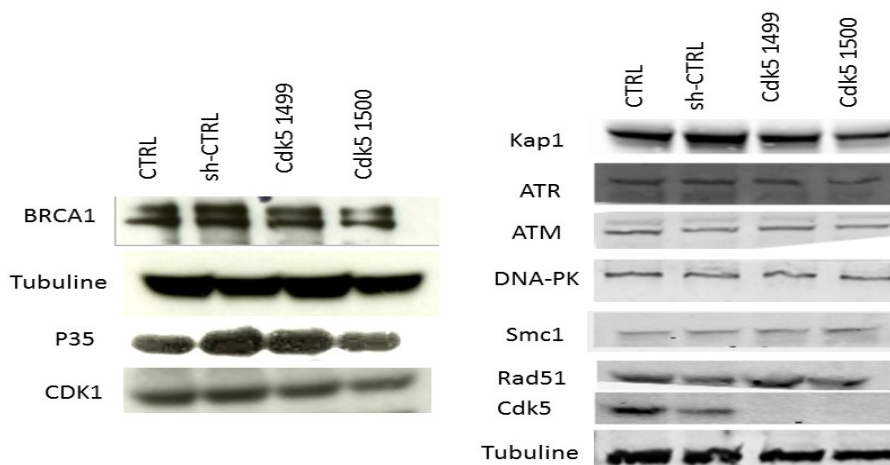


Figure 27 : Caractérisation des lignées HeLa Contrôles (CTRL et shCTRL) et Cdk5 KD (Cdk5-1499 et Cdk5-1500)

Western blot représentatif de l'expression basale des différentes protéines de la signalisation et réparation des dommages, dans les clones HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD.

3.2 Réponse des lignées Cdk5 KD aux dommages radio-induits

3.2.1 Les lignées HeLa Cdk5 KD présentent un point de contrôle intra-S altéré

Afin d'analyser le point de contrôle en phase S nous avons suivi par cytométrie en flux (FACS) la distribution des cellules au cours du cycle cellulaire, par une récolte des différents clones à différents temps post irradiation avec une source de 137 Césium à des doses de 2 et 5 Grays (**Figure 28**). Les résultats obtenus montrent que dans les lignées Contrôles, l'irradiation d'une population cellulaire asynchrone aux doses de 2 et 5 Gy entraîne une accumulation des cellules en phase S (mesuré par FACS, par la méthode décrite dans le travail de Fernet *et al.* (Fernet et al., 2010)). Les cellules répondent de manière dose dépendante, comme attendu, avec une accumulation maximale atteinte 8 heures post irradiation, indiquant une activation du point de contrôle en phase S. Les cellules Cdk5 KD s'arrêtent également, avec une cinétique similaire mais une amplitude moindre, suggérant une altération du point de contrôle intra-S en absence de Cdk5.

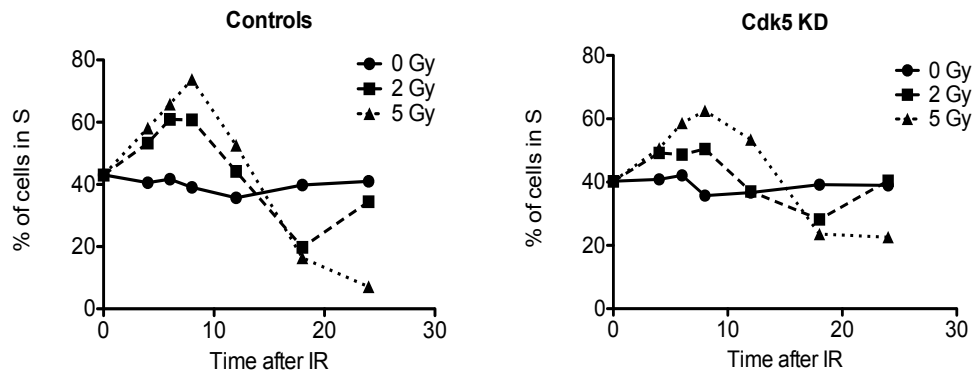


Figure 28: Déficience du checkpoint en phase S post irradiation

Progression en phase S de populations cellulaires asynchrones Contrôles (à gauche) ou Cdk5 KD (à droite) non traitées ou irradiées à 2 Gy et 5 Gy. Les cellules sontensemencées et exposées ou non aux rayons gamma après adhésion. Après un marquage au BrdU (10 μ M, 15 min), les cellules sont récoltées aux temps indiqués, et le pourcentage de cellules en phase S est déterminé par Cytométrie de flux après immunomarquage anti-BrdU. Les données présentées correspondent à une expérience représentative des 3 réalisées

3.3 Les lignées HeLa Cdk5 KD présentent un point de contrôle G2/M altéré

Nous avons également analysé le rôle de la protéine Cdk5 dans l'activation du point de contrôle G2/M. Pour cela nous avons suivi des populations de cellules asynchrones, non traitées ou irradiées à 2 et 5 Gy tout au long du cycle cellulaire, et nous avons quantifié le pourcentage de cellules en G2/M post irradiation. Comme attendu, les cellules Contrôles s'accumulent en G2/M de manière dose-dépendante, tant en termes d'amplitude que de cinétique (**Figure 29**). Les cellules Cdk5 KD montrent une accumulation réduite en G2/M en comparaison avec les lignées Contrôles, avec une cinétique toutefois similaire, indiquant que, tout comme pour l'arrêt en phase S l'absence de Cdk5 conduit à un arrêt en G2/M moins efficace. La quantification par cytométrie de flux des cellules mitotiques par une détection de l'histone H3 phosphorylée 1h après irradiation indique une augmentation du pourcentage de cellules en mitose en absence de Cdk5, confortant ces observations en montrant un défaut du point de contrôle précoce qui bloque l'entrée en mitose des cellules irradiées en G2 (résultats non présentés).

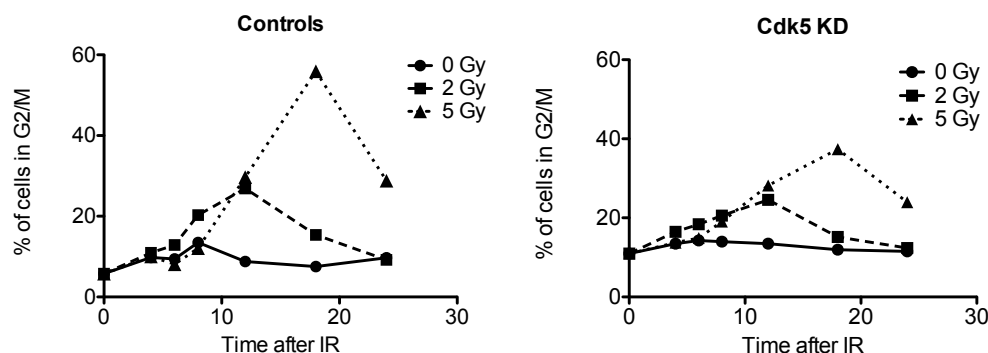


Figure 29 : Altération du point de contrôle G2/M post irradiation

Progression en phase G2/M de populations cellulaires asynchrones Contrôles (à gauche) ou Cdk5 KD (à droite) non traitées ou irradiées à 2 Gy et 5 Gy. Les cellules sontensemencées et exposées ou non aux rayons gamma après adhésion. Les cellules sont récoltées aux temps indiqués, et le pourcentage de cellules en phase G2/M est déterminé par Cytométrie de flux après un marquage à l'iodure de propidium. Les données présentées correspondent à une expérience représentative des 3 réalisées.

3.4 Les lignées HeLa Cdk5 KD activent les cascades de signalisation des dommages en réponse aux RI

Suite à une irradiation, les cellules endommagées par l'effet des RI initient la signalisation des dommages qui va permettre la mise en place des points de contrôle du cycle et la réparation. Cette signalisation dépend de l'activation des voies ATM et ATR (Thompson, 2012). Afin de déterminer si ces voies de signalisation sont correctement activées en réponse aux irradiations en l'absence de Cdk5, nous avons analysé par westerns blot l'état de phosphorylation des différentes cibles d'ATM et d'ATR 30 minutes après exposition de populations asynchrones à des doses de 2 et 5 Gy (**Figure 30**). Nous avons ainsi étudié la phosphorylation des protéines Chk1, Chk2, SMC1 et KAP1. Les résultats présentés ne montrent pas de différence dans la phosphorylation de ces cibles après irradiation entre les lignées déplétées pour Cdk5 et les lignées Contrôles. Ceci suggère qu'en absence de Cdk5, et dans nos conditions expérimentales, les cascades dépendantes d'ATM et ATR sont correctement activées en réponse à une irradiation gamma. Nous ne pouvons pas exclure que l'altération des points de contrôles intra-S et G2/M observée dans les cellules déplétées pour Cdk5 soit le résultat d'une sortie prématurée de l'arrêt du cycle, l'étude des cinétiques de phosphorylation des protéines impliquées dans la persistance et la sortie des arrêts du cycle doit être réalisée pour répondre à cette question.

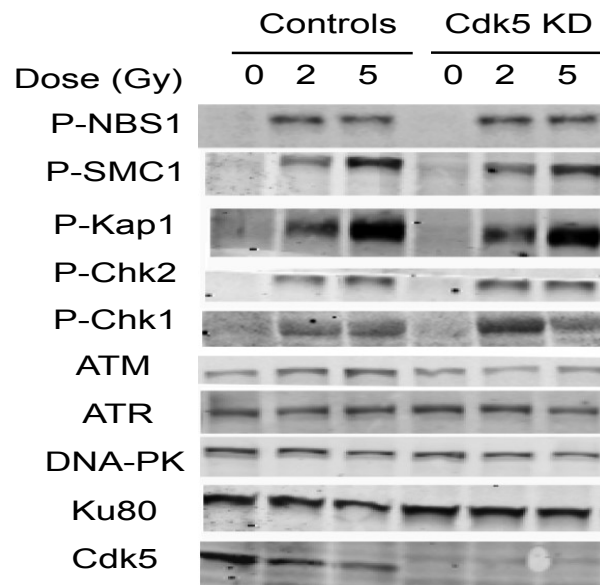


Figure 30 : activation des cascades de signalisation ATM et ATR dépendantes post irradiation

Exemple de Western blot réalisé à partir d'extraits cellulaires totaux (extraction cell signaling), représentatif des données obtenues dans les lignées Contrôles et Cdk5 KD, 30 min post irradiation à des doses de 2Gy et 5Gy.

Etant donné l'altération du point de contrôle de phase S, nous avons voulu savoir si les cellules déficientes en Cdk5 présentaient une sensibilité augmentée aux radiations en phase S. J'ai mesuré la survie clonogénique des lignées Contrôles et Cdk5 KD irradiées après une synchronisation en phase S à l'aide d'un double-bloc de thymidine. Les résultats obtenus (**Figure 31**) montrent que les lignées Cdk5 KD présentent une hypersensibilité en phase S, avec un ratio de la fraction survivante à 2 Gy (SF2) dans les cellules synchronisées vs les cellules asynchrones de 1.5 ± 0.16 dans les lignées Contrôles et 1.06 ± 0.20 dans les lignées HeLa Cdk5 KD, ($P = 0.004$, test de student).

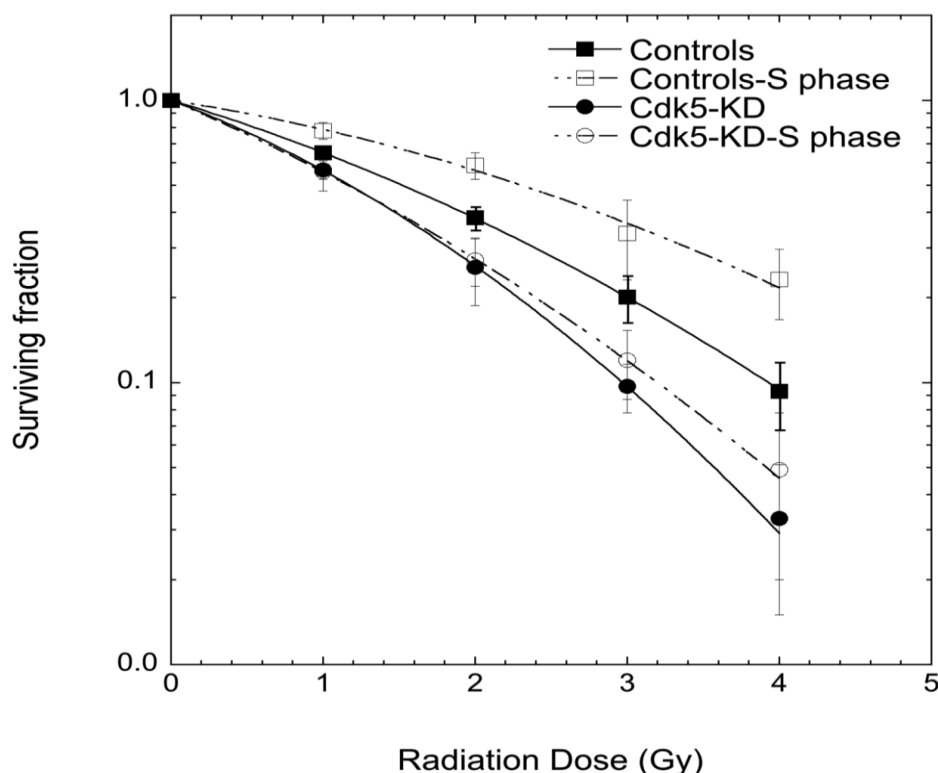


Figure 31: Survie clonogénique des lignées HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD à des doses croissantes de rayonnements gamma, asynchrones et après une synchronisation en phase S

Les lignées HeLa sont synchronisées par un double bloc de thymidine. Les cellules sont traitées une première fois pendant 19 heures avec du milieu contenant de la thymidine (2 μ M), le milieu est ensuite retiré et remplacé par du milieu sans drogue pendant 9 heures. Les cellules sont traitées une seconde fois pendant 17 heures avec du milieu contenant de la thymidine (2 μ M). Deux heures après le dernier lever de bloc, les cellules synchronisées ou non synchronisées, sontensemencées puis irradiées après adhésion à des doses de 0, 1, 2, 3 et 4 Gy). Après 10 à 15 jours de croissance, les cellules sont fixées et comptées, les fractions de cellules survivantes (ratio irradiées vs non irradiées) sont calculées. Les données représentées sont la moyenne de 2 expériences réalisées en triplicat.

Sur la base de ce résultats et de l'observation d'une altération du point de contrôle en phase S, j'ai analysé l'activation des voies ATM et ATR spécifiquement en phase S (**Figure 32**).

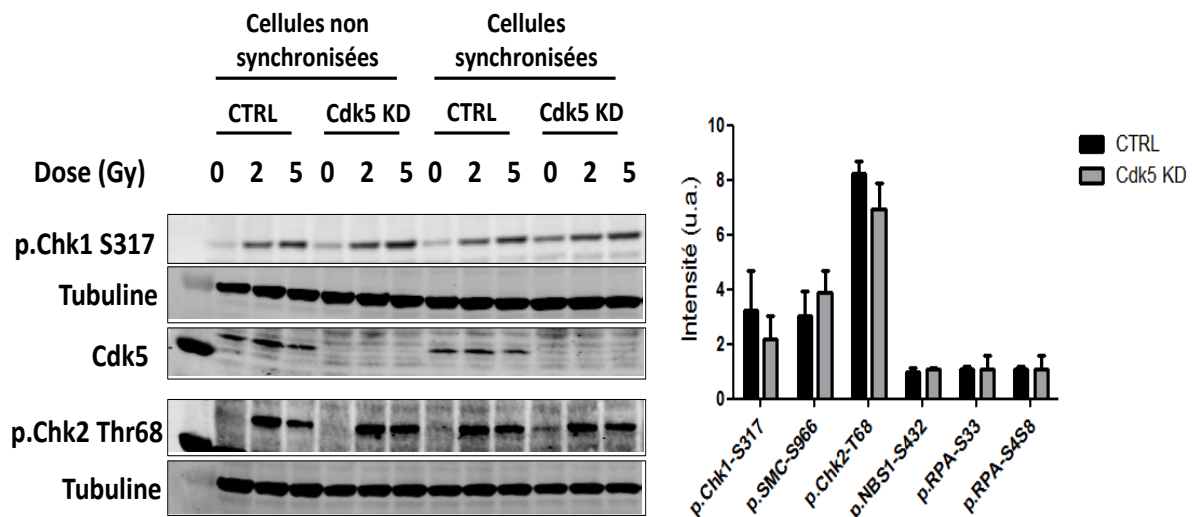


Figure 32: Activation des cascades de signalisation ATM et ATR dépendantes post irradiation en phase S

(A) Exemple de Western blot réalisé à partir d'extraits cellulaires totaux (extraction cell signaling), représentatif des données obtenues dans les lignées Contrôles et Cdk5 KD, 30 min post irradiation à des doses de 2Gy et 5Gy sur des cellules synchronisées en phase S par un double-bloc de thymidine (voir figure 29)..(B) Quantification des différentes protéines cibles d'ATM et ATR en phase S, les données sont représentées en ratio d'intensité des extraits en phase S (traités 5Gy/non traités) après normalisation avec l'intensité de la tubuline. Les données sont une moyenne \pm SD d'au moins 4 expériences indépendantes.

De façon surprenante, nous n'avons pas détecté de défaut de phosphorylation des cibles de l'activation des voies des points de contrôles post irradiation en phase S. De plus, nous n'avons observé qu'une très faible induction de la phosphorylation de la protéine RPA sur les serines S4S8 et S33 après irradiation, contrairement aux observations faite après traitement HU (Article en révision).

3.5 L'inhibition de Cdk5 sensibilise les cellules à l'inhibition de DNA-PK

Afin de comprendre dans quelle voie de signalisation Cdk5 pourrait être impliquée, j'ai testé l'effet de l'inhibition de Cdk5 sur les différents inhibiteurs de PI3K : ATM ATR et DNA-PK. Pour cela, j'ai fait des survies clonogéniques dans les lignées HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD en absence et en présence de ces inhibiteurs, dans un premier temps sans traitement par des RI. Les résultats des survies sont représentés ci-dessous (**Figure 33**).

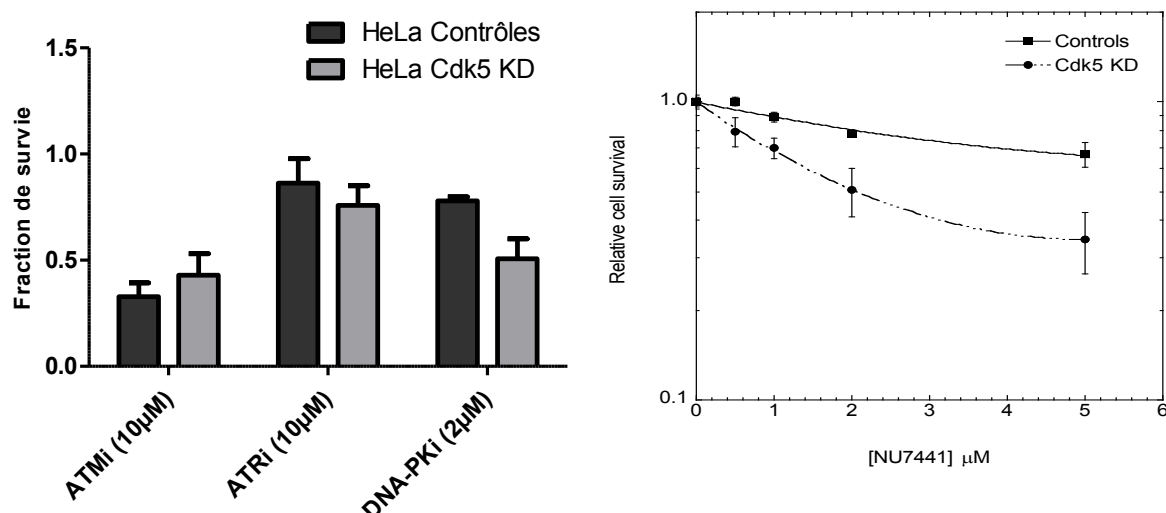


Figure 33: Survie clonogénique des lignées HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD traitées avec des inhibiteurs de PI3K

Les lignées HeLa asynchrones sontensemencées en triplicat et traitées avec les inhibiteurs (ATMi : NU55933, 10 µM), (ATRi : NU6027, 10 µM), (DNA-PKi : NU7441, 2 µM), 24 heures après traitement, les cellules sont rincées et remises en incubateur pendant 12 jours. Les cellules sont ensuite fixées et comptées, les fractions de survies aux différentes doses d'inhibiteurs sont représentés ci-dessus, les données sont la moyennes de 4 expériences indépendantes. Les résultats sont statistiquement différents dans le cas de l'inhibiteur de DNA-PK ($P < 0.0001$). Sur le panel de droite, survie clonogénique après 24h de traitement avec une gamme de concentrations de NU7441.

Les résultats des survies présentées (**Figure 33**), montrent que l'inhibition de Cdk5 ne sensibilise pas les cellules aux inhibiteurs d'ATM ou d'ATR. En revanche, la déplétion en Cdk5 sensibilise de façon significative à l'inhibition de la DNA-PK par traitement au NU7441, et ce à toutes les concentrations testées. J'ai également confirmé cet effet par l'utilisation d'un autre inhibiteur de DNA-PK (NU7026, résultats non présentés). Cette sensibilité exacerbée à l'inhibition de Cdk5 en absence de dommages suggère une implication de Cdk5 dans une voie de signalisation importante pour la survie cellulaire différente de la voie DNA-PK dépendante.

Nous avons voulu savoir si l'inhibition de DNA-PK avait un effet différent en présence et en absence de Cdk5 sur la survie cellulaire après induction de dommages. Pour cela j'ai effectué d'autres survies clonogéniques dans les lignées HeLa Contrôles et Cdk5 KD, en traitant les différentes lignées simultanément avec un inhibiteur de DNA-PK (pendant 24h) et des rayons, les résultats sont présentés **Figure 34**.

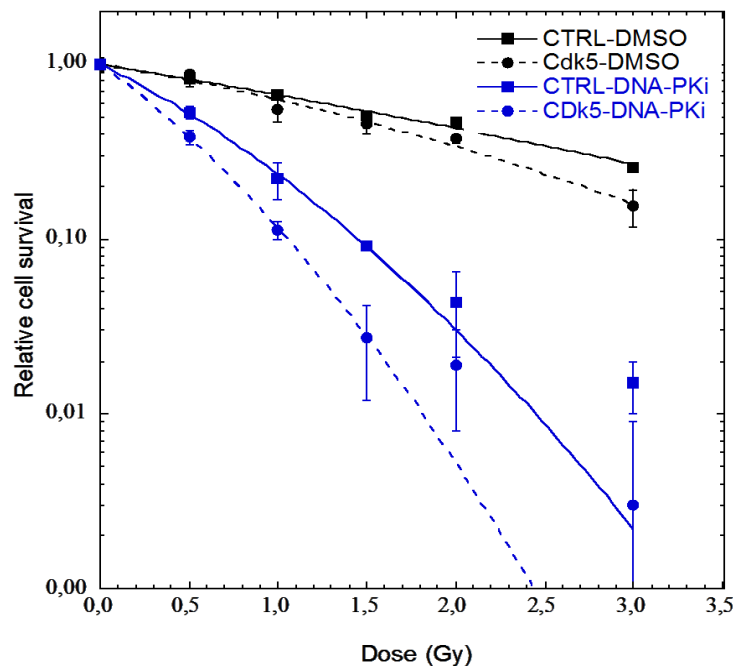


Figure 34: Survie clonogénique des lignées HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD après irradiation en présence de l'inhibiteur de DNA-PK NU7441

Les lignées HeLa asynchrones sontensemencées, traitées avec l'inhibiteur de DNA-PKi (NU7441, 1 μ M) pendant 1h ou avec du DMSO seul (en noir) puis irradiées avec une source de ^{137}Cs et l'inhibiteur est enlevé par rinçage 23h après l'irradiation. Après 10 à 15 jours de croissance, les cellules sont fixées et comptées, les fractions de survies aux différentes doses sont représentées ci-dessus, les données sont des moyennes de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicat avec les quatre clones (« Controls » étant la moyenne des 2 clones Contrôles et « Cdk5 KD » la moyenne des 2 clones Cdk5-1499, Cdk5-1500).

L'inhibition de DNA-PK entraîne une grande radiosensibilisation des lignées HeLa et les conséquences de l'absence de Cdk5 sont plus importantes en termes de survie cellulaire lorsque la DNA-PK est inhibée. En effet, le ratio des SF2 des lignées Contrôles vs Cdk5 KD est de 1,25 en moyenne sans inhibiteur et de 2,25 en présence de NU7441.

De la même façon, nous avons voulu savoir si la présence de l'inhibiteur de DNA-PK modifie la réponse au HU, pour cela nous avons traité les cellules pendant 24 heures au HU (2 mM), puis inhibé la DNA-PK pendant 24 heures. Les résultats de la survie clonogénique sont représentés **figure 35**.

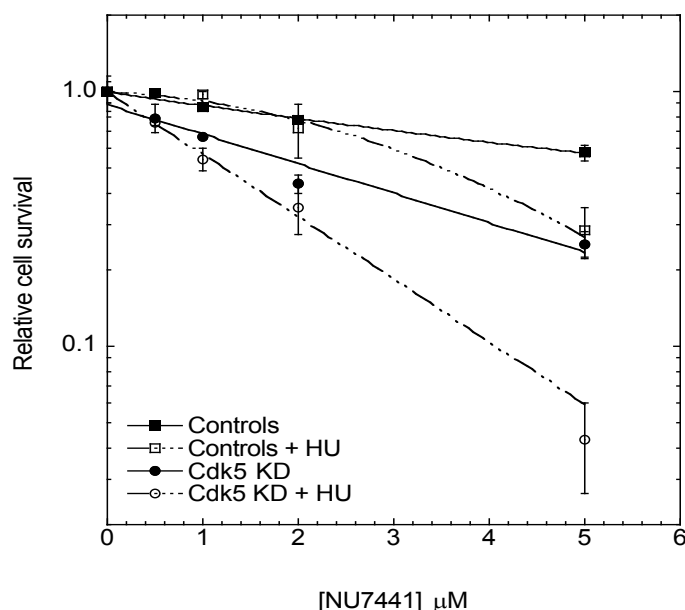


Figure 35 Survie clonogénique des lignées HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD à l'inhibiteur de DNA-PK associé aux HU

Les lignées Hela asynchrones sont ensemencées puis traitées pendant 24 heures au HU afin de bloquer les fourches de réplication et d'induire des lésions à l'ADN ou laissées sans traitement. Les cellules sont rincées et traitées à l'inhibiteurs de DNA-PK NU7441 pendant 24 heures supplémentaires. Les cellules sont ensuite rincées et incubées dans du milieu sans drogue, au bout de 12 jours de croissance, les colonies sont fixées et comptées. Les fractions de survies aux différentes concentrations sont représentées ci-dessus, les données sont des moyennes de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat avec les quatre clones (« Contrôles » étant la moyenne des 2 clones Contrôles et « Cdk5 KD » la moyenne des 2 clones Cdk5-1499, Cdk5-1500).

L'ensemble des résultats obtenus après inhibition de la DNA-PK et induction de dommages par irradiation gamma ou traitement HU montre que la fonction de la DNA-PK est nécessaire à la survie des cellules en l'absence de la kinase Cdk5. Ces observations suggèrent un rôle pour le NHEJ dans la réparation des dommages induits par les radiations et par un stress réplcatif dans les cellules déficientes pour Cdk5.

3.6 Conclusions

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent qu'en réponse aux RI, Cdk5 est requise pour une bonne efficacité des points de contrôle du cycle cellulaire, en phase S et en phase G2 et pour la survie cellulaire, plus particulièrement en phase S. Notre analyse de l'activation des voies de signalisation des dommages dépendantes d'ATM et ATR n'a pas permis de mettre en évidence de défaut en absence de Cdk5, suggérant que la mise en place des arrêts du cycle peut se faire en absence de Cdk5. On peut imaginer que l'implication de Cdk5 se situerait

plutôt au niveau des mécanismes contrôlant le maintien de ces points de contrôle par la régulation de l'activité de protéines comme PLK1 (Polo-like kinase 1) par exemple en ce qui concerne l'arrêt en G2. Nos travaux ont montré un rôle de Cdk5 dans le contrôle des fourches de réplication après un stress réplicatif, il est envisageable que la fonction de Cdk5 dans la répression de l'initiation des fourches s'exerce également après exposition aux RI (Willis and Rhind, 2009). L'activation d'effecteurs plus en aval du processus tels que CDC25 et le complexe Cyclin E/Cdk2 doit être étudiée.

L'altération des points de contrôle du cycle peut contribuer à la diminution de la survie cellulaire observée après irradiation, la réduction de l'arrêt en G2 peut notamment entraîner des défauts de ségrégation des chromosomes qui conduisent à la mort cellulaire. Les défauts de réparation des dommages radio-induits sont également des causes majeures de radiosensibilité. L'absence de défaut de religation des cassures simple brin de l'ADN induites par les rayons observée par l'analyse par élution alcaline (Bolin et al., 2012) ainsi les tests comètes (Figure 3 de l'article) suggèrent que la réparation de ces dommages radio-induits se fait correctement dans les cellules déplétées pour Cdk5. De plus, l'absence de sensibilité à la néocarzinostatine suggère également que la protéine Cdk5 n'est pas essentielle à la réparation des cassures double brin induite de manière directe (Bolin et al., 2012). Nous avons également mesuré le nombre de cassures résiduelles 24 heures après un traitement de 2 Gy par la quantification des foyers γ H2AX et 53BP1. Les résultats obtenus dans les lignées Cdk5 KD sont similaires à ceux des lignées Contrôles (données non présentées).

Néanmoins, la sensibilité des cellules déplétées pour Cdk5 à l'inhibition de la DNA-PK suggère que la réparation de cassures double brin par NHEJ joue un rôle prépondérant dans les lignées Cdk5 KD. Les résultats de Patel *et al.* (Patel et al., 2011) qui avaient revisité le modèle de létalité synthétique, ont montré que la sensibilité des cellules déficientes pour BRCA1 aux inhibiteurs de PARPs n'était pas due au rôle de la protéine PARP-1 dans la réparation de certains dommages simple brin, mais à une augmentation de la réparation par la voie du NHEJ. En effet, la réparation des cassures double brin par NHEJ est extrêmement « error-prone » et de fait génère un niveau élevé de réarrangements chromosomiques qui induisent la mort cellulaire (Helleday, 2011). Etant donné que les lignées Cdk5 KD présentent également une sensibilité augmentée aux inhibiteurs de PARP, nous pouvons faire l'hypothèse que les CDBs formées en réponse aux radiations et plus particulièrement au niveau des fourches de réplication, pourraient être réparées par le NHEJ en absence de Cdk5. (**voir Figure 36**). Afin de tester cette hypothèse il faudrait faire des analyses cytogénétiques pour mesurer les aberrations chromosomiques telles que les cassures chromosomiques, les

structures radiales... Une analyse des micronoyaux serait également intéressante et enfin, il est possible de faire une mesure directe de l'efficacité du NHEJ par transfection de plasmides spécifiques dans les cellules (Guirouilh-Barbat et al., 2004).

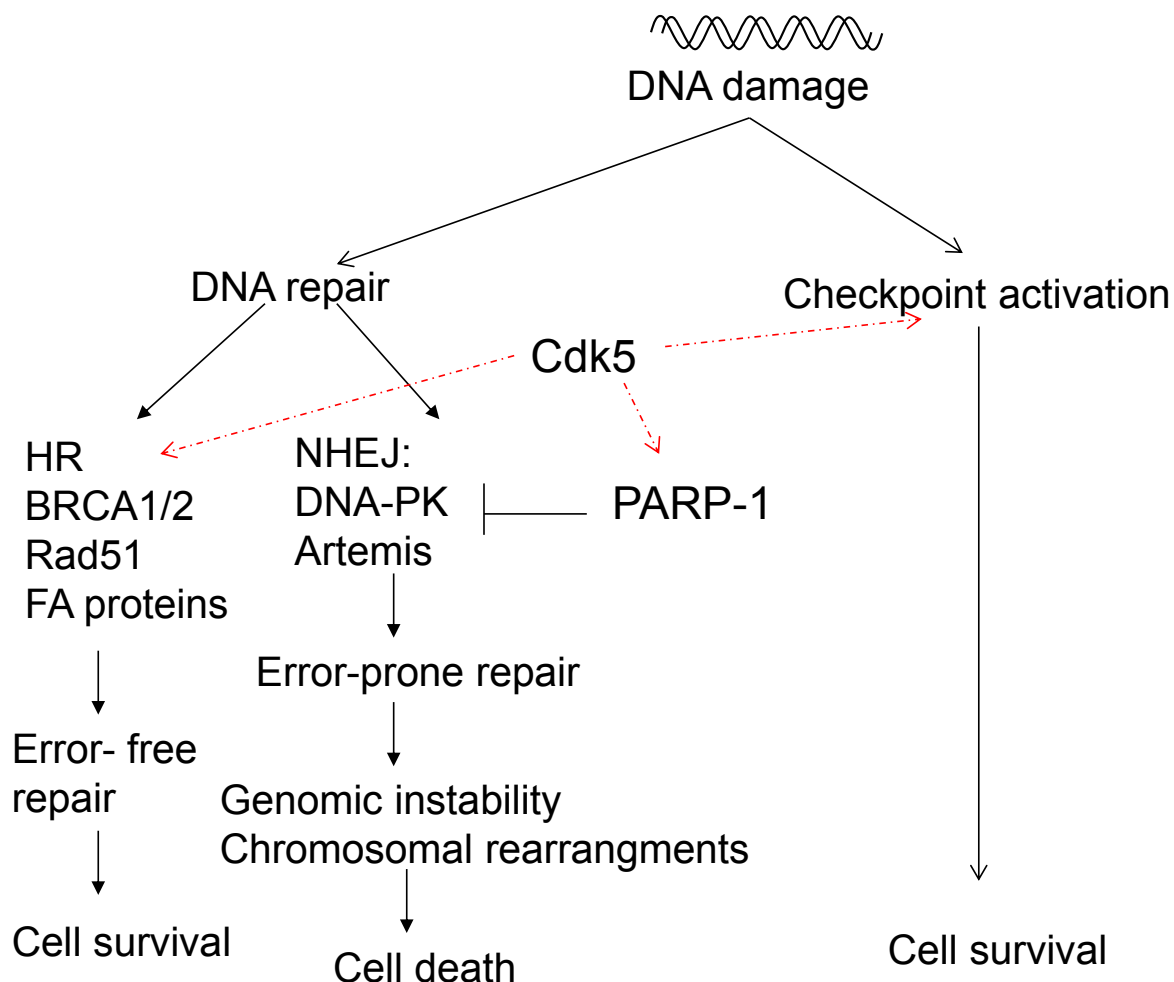


Figure 36: Modèle proposant les effets de la déplétion de Cdk5 sur la survie cellulaire (modifiée à partir de (Patel et al., 2011))

Dans ce modèle Patel et al. (Patel et al., 2011) démontrent que l'inhibition de la PARP, augmente la réparation par NHEJ et par conséquent l'instabilité génomique létale. Nous avons montré que l'absence de Cdk5 sensibilisait aux inhibiteurs de DNA-PK, ainsi qu'aux inhibiteurs de PARP, par conséquent, il est possible que Cdk5 agisse soit en synergie avec la PARP permettant l'inhibition du NHEJ, soit par un autre mécanisme qui reste à définir régulant la balance HR/NHEJ. Enfin le rôle de la protéine Cdk5 dans l'activation du point de contrôle G2/M peut également expliquer la sensibilité des lignées HeLa Cdk5 KD.



DISCUSSION

Cette dernière décennie a été marquée par la mise en évidence de nombreux rôles de la protéine Cdk5 en dehors des neurones, avec notamment les travaux de Turner *et al.* en 2008 (Turner et al., 2008) et Gagné *et al.* en 2009 (Gagne et al., 2009) qui ont montré un rôle de la protéine Cdk5 en réponse aux dommages et établi un lien entre la protéine PARP-1 et Cdk5. Depuis, plusieurs autres études ont été réalisées afin de mieux caractériser ce rôle. Les travaux de notre équipe ont pu montrer que la protéine Cdk5 est nécessaire à la persistance de PARP-1 aux sites de dommages induits par micro-irradiation laser. Ce résultat et l'observation qu'en réponse à l'induction de dommages, le niveau de synthèse de PAR dans les cellules déléptées pour Cdk5 est supérieur au niveau observé dans les cellules Contrôles suggèrent que Cdk5 régule négativement l'activité de PARP-1 (Bolin et al., 2012). Courapied *et al.* ont montré que la protéine Cdk5 intervient dans la régulation négative du facteur de transcription STAT3 par la phosphorylation d'un site qui réduit son activité en réponse à une inhibition de la topoisomérase I, et qui réduit l'expression des gènes *Cycline D* et *c-myc* impliqués dans la progression en G2/M (Courapied et al., 2010). Lee *et al.* ont également localisé la kinase Cdk5 au niveau des centrosomes des cellules HeLa au cours de la mitose et suggéré que Cdk5 serait impliquée dans la cytokinèse et que son absence serait associée à une augmentation de l'aneuploïdie (Lee et al., 2010). Dans l'ensemble, ces études laissent penser qu'en réponse à l'induction de dommages de l'ADN, la kinase Cdk5 pourrait jouer un rôle dans la réparation, la régulation de la progression du cycle cellulaire et le maintien de la stabilité du génome. Lors des études réalisées au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'implication de la protéine Cdk5 dans la réponse cellulaire aux dommages induits par une irradiation gamma mais aussi par des drogues tel que le HU et l'aphidicoline induisant de manière plus spécifique un stress réplicatif. J'ai montré que la protéine Cdk5 est requise en absence de dommages pour la survie cellulaire et la progression des fourches de réplication. De plus, Cdk5 est nécessaire pour la survie des cellules, et l'activation du point de contrôles intra-S en réponse en réponse aux stress génotoxiques induits par les rayons ou par un stress réplicatif induit par le HU. Dans le cas des traitements au HU, il a été montré que l'activation du point de contrôle intra-S se fait suite au découplage du complexe ADN hélicase/polymérase (Carr and Lambert, 2013; Lambert and Carr, 2013a; Magdalou et al., 2014). Ce découplage entraîne la formation d'ADN simple brin et active le point de contrôle particulièrement via la protéine ATR. L'observation d'un niveau d'ADN simple brin diminuée dans les lignées HeLa Cdk5 KD en comparaison avec les lignées HeLa Contrôles, nous laisse spéculer que la protéine Cdk5 serait impliquée dans l'amplification de la signalisation intra-S, soit par un rôle dans la résection (Daley and Sung, 2014), soit par la promotion du découplage du complexe

helicase/polymérase suite à un dommage répliatif (Byun et al., 2005). De ce fait, l'absence de Cdk5 retarde et réduit l'activation ATR dépendante et la phosphorylation des protéines du point de contrôle intra-S notamment SMC1, Chk1 et RPA.

Nos travaux ont également montré que la protéine RPA était un substrat de Cdk5 *in-vitro*, et possiblement *in-vivo*. Nous proposons que la phosphorylation de RPA par Cdk5 pourrait être l'un des médiateurs de la réponse cellulaire induite par un stress répliatif.

Enfin, de nombreux agents anti-cancéreux ciblent les cellules en prolifération en interférant avec la réplication de l'ADN. Etant donné que Cdk5 semble requis pour ce processus, nous nous sommes intéressés au lien potentiel entre l'expression de Cdk5 et la réponse au traitement. Nous avons déterminé le profil d'expression de Cdk5 dans un panel de tumeurs du sein et montré que dans notre cohorte, ce profil est associé à un meilleur pronostic en termes de survie sans métastases des patientes.

1. Cdk5 : une protéine nécessaire à la croissance et à la survie cellulaire

En absence de dommages, l'inactivation de la protéine Cdk5 est embryonnaire létale chez la souris. Cette mortalité a été associée à son rôle dans le développement neuronal, les souris Cdk5^{-/-} présentent un positionnement anormal des neurones dans le cortex cérébral (Ohshima and Mikoshiba, 2002; Ohshima et al., 1996). Des travaux réalisés sur des neurones de souris ont montré que la kinase Cdk5 a la capacité de promouvoir la survie cellulaire par l'activation de la voie PI3K/Akt. Cette activation passe par la phosphorylation des récepteurs membranaires ErbB2 et ErbB3. La voie anti-apoptotique PI3K/Akt cible des substrats tels que la caspase 9 et Bad et les inhibent afin de promouvoir la survie cellulaire (Li et al., 2003).

Nos travaux montrent qu'en dehors des neurones également la déplétion de Cdk5 affecte la survie cellulaire, cela a été observé dans différents modèles tumoraux : des cellules HeLa déplétées pour Cdk5 par transfection stable d'un shRNA (Cdk5 KD), des populations de cellules U2OS transfectées avec ces mêmes shRNA et diverses lignées de cancer du sein transfectées avec un siRNA dirigé contre Cdk5 (résultats en annexe I). De plus, la croissance des lignées HeLa Cdk5 KD est fortement diminuée en comparaison avec des lignées HeLa Contrôles, avec un temps de doublement de 33 heures dans les lignées Cdk5 KD et de 22 heures dans les lignées HeLa Contrôles. Ce ralentissement de la croissance a également été observé avec les lignées de cancer du sein.

Nos résultats sont en cohérence avec les travaux de Feldman *et al.* qui ont montré que l'inhibition de Cdk5 par l'utilisation d'un mutant dominant négatif exprimé dans les cellules

réduit fortement la croissance et la migration tumorale dans des lignées établies à partir de tumeurs du pancréas (Feldmann et al., 2010). Cette équipe suggère que la protéine Cdk5 serait requise pour la stimulation des GTPases de la voie Ras (Rat Sarcoma), ces protéines étant nécessaires pour la prolifération cellulaire et souvent dérégulées dans les processus de tumorigenèse (van Hattum and Waldmann, 2014). Les récents travaux de Xu *et al.* ont également montré qu'une déplétion de Cdk5 entraîne dans deux lignées épithéliales issues de cancer du sein (MCF-10A et MDA-MB) une diminution dramatique de la prolifération (Xu et al., 2014), ainsi qu'une réduction de la survie clonogénique. Dans ces travaux, Xu *et al.* ont identifié un nouveau complexe composé de la kinase Cdk5 et de deux autres protéines KIAA0528 et FIBP qui serait nécessaire à la croissance cellulaire, en revanche le mécanisme par lequel ce complexe agit reste encore à définir. Il est donc possible que dans nos lignées cellulaires, Cdk5 soit impliquée dans la croissance cellulaire par l'une des deux voies précédemment proposées (Feldmann et al., 2010; Xu et al., 2014). Mais un nouveau paramètre doit également être considéré : nos travaux ont mis en évidence l'implication de Cdk5 dans la progression normale en phase S (voir paragraphe suivant), par la régulation positive de la réplication, et cette observation peut également expliquer la réduction de croissance cellulaire observée dans les lignées Cdk5 KD.

2. Cdk5 favorise la progression des fourches de réplication

Dans notre modèle cellulaire HeLa, nous avons pu montrer par l'utilisation de la technique de peignage moléculaire, que les lignées déplétées pour Cdk5 présentaient un ralentissement de la progression des fourches de réplication, avec une réduction de la vitesse de 18% dans les cellules Cdk5 KD par rapport aux cellules Contrôles. Ce ralentissement n'est pas compensé par l'initiation de nouvelles origines de réplication puisque la mesure de la densité des fourches, évaluée par le nombre de fourches activées par mégabase d'ADN, est également réduite dans les lignées Cdk5 KD en comparaison avec les lignées Contrôles. Ces résultats suggèrent pour la première fois un rôle de la protéine Cdk5 dans l'activation des fourches de réplication, mesurée par le nombre de fourches actives en absence de dommages. Cette nouvelle observation pourrait fournir une explication à l'implication de Cdk5 qui a été décrite dans la croissance cellulaire. En revanche, il reste encore à identifier le rôle précis de la protéine Cdk5 au cours de la réplication, ainsi que ses protéines partenaires.

La réduction de la vitesse moyenne de la fourche de réplication peut être due à deux phénomènes : (1) un ralentissement global de la progression des fourches de réplication ou (2)

un blocage de certaines fourches qui entraîne un ralentissement de la vitesse moyenne des fourches.

Les récents travaux de Nagano *et al.* sont en faveur de la première hypothèse. En effet, ce groupe a identifié une interaction directe entre la protéine Cdk5 et la cycline I dans des cellules HeLa en prolifération (Nagano et al., 2013) et montré que le niveau de la cycline I oscille au cours de la progression cellulaire, augmentant de façon significative au cours de la phase S. Ils ont également observé un ralentissement de la progression cellulaire après inhibition de la Cycline I, et de façon intéressante une interaction entre la Cycline I et la kinase Cdk5 *in vivo*. La cycline I a longtemps été considérée comme n'ayant pas de rôle dans la progression de la phase S (Nakamura et al., 1995), mais ces récentes observations, associées au fait que d'autres travaux avaient également démontré une interaction entre la Cycline I et Cdk5 dans d'autres modèles cellulaires (Brinkkoetter et al., 2009; Brinkkoetter et al., 2010; Taniguchi et al., 2012), nous laissent spéculer une éventuelle implication de ce complexe dans le déroulement de la réplication. De plus une autre étude avait identifié une interaction entre la kinase Cdk5 et la protéine PCNA (Loor et al., 1997). La protéine PCNA est nécessaire à la fourche de réplication, et une interaction avec Cdk2 avait déjà été démontrée au cours de la phase S (Koundrioukoff et al., 2000), suggérant une fois de plus, que la kinase Cdk5 pourrait également être impliquée au niveau du réplisome. En effet, d'autres Cdk5 sont connues pour être nécessaires à l'initiation des événements réplcatifs, notamment Cdk2, qui partage plus de 65% d'homologie avec Cdk5 ; l'augmentation de l'activité kinase de Cdk2 est requise pour l'activation du complexe Pré-RC (Depamphilis et al., 2012), et l'absence de Cdk2 ralentit la fourche de réplication (Shechter et al., 2004a). Toutefois, de façon très intrigante, d'autres études montrent que dans des souris, la kinase Cdk2 ne serait pas indispensable pour la prolifération en phase S, et que toutes les Cdk5 du cycle, mutées individuellement, peuvent être remplacées par Cdk1. Cette observation met en évidence la possibilité d'un effet compensatoire entre les Cdk5, qui en plus de leurs rôle spécifique partageraient certaines cibles communes (Enders, 2012; Pacek et al., 2004). La réduction globale de la vitesse de réplication peut également être la conséquence d'un appauvrissement en pool de dNTPs (Anglana et al., 2003; Malinsky et al., 2001). En effet, l'enrichissement du milieu de culture par des dNTP augmente la vitesse de réplication et réduit le nombre de fourches initiées alors qu'un appauvrissement du pool réduit la vitesse des fourches. Dans ce dernier cas, les cellules augmentent le nombre d'origines initiées afin de finaliser la phase de synthèse (Tuduri et al., 2010). Dans le cas des lignées HeLa Cdk5 KD, la vitesse de réplication est réduite, et cet événement n'est pas compensé par une augmentation

des évènements d'initiation étant donné que la densité des fourches est également inférieure à celle observée dans les lignées Contrôles. Nous avons initié dans nos lignées HeLa Contrôles et Cdk5 KD la mesure du pool de nucléotide en collaboration avec l'équipe du Dr Jérôme Guitton du laboratoire du Centre hospitalier Lyon-Sud. Les premiers résultats préliminaires (Annexe II), ne montrent pas de différence significative du pool de dNTP en l'absence de Cdk5 en absence de stress exogène, écartant ainsi la possibilité que Cdk5 soit impliquée dans la régulation ou la synthèse de nucléotides. Afin de confirmer ce résultat, d'autres expériences sont en cours de réalisation.

La deuxième hypothèse que nous abordons suggère que le blocage de certaines fourches pourrait générer un ralentissement de la vitesse moyenne des fourches. En absence de stress exogène, nous avons observé dans la lignée Cdk5 KD un nombre de foyers RPA S4S8 (article en révision) et 53BP1 plus élevé particulièrement en phase S (Annexe III), suggérant que la déplétion en Cdk5 génère un stress réplicatif endogène. Ce stress pourrait être lié à la fonction de Cdk5 dans la réplication, en effet le ralentissement de la fourche de réplication peut générer des collisions avec d'autres machineries, particulièrement au niveau des régions dites difficiles à répliquer du fait d'un appauvrissement en origines dormantes (Magdalou et al., 2014). Ce ralentissement peut de ce fait générer un stress endogène et des lésions à l'ADN. Cependant, ce stress endogène détecté par immunofluorescence (accumulation de foyers) n'a pu être corrélé avec une augmentation significative de l'activation des voies de signalisation dans les lignées HeLa (par la mesure de la phosphorylation de la protéine Chk1 en absence de dommages par westerns blot). Par conséquent, la deuxième hypothèse selon laquelle le ralentissement de la progression des fourches en absence de Cdk5 pourrait être dû à un plus grand nombre de fourches bloquées a été exclue, puisque j'ai pu évaluer par peignage moléculaire que le taux de fourches asymétriques (indicatif des blocages de fourches) n'est pas plus élevé en absence de Cdk5 (Techer et al., 2013). En effet, nos résultats montrent qu'après un traitement de deux heures au HU (2mM), le ratio (IdU/CldU) dans les lignées HeLa Cdk5 KD, n'est pas significativement différent de celui obtenu dans les lignées Contrôles (voir résultats supplémentaires du papier en révision).

3. L'absence de Cdk5 affecte le point de contrôle en phase S

Nos travaux ont permis de confirmer les observations de Turner *et al.* qui avaient montré pour la première fois que la protéine Cdk5 était impliquée dans l'activation du point de contrôle en phase S post irradiation, et nous avons montré un défaut de ce point de contrôle en réponse au stress réplicatif, induit par traitement HU. Plusieurs mécanismes moléculaires sont possibles pour expliquer ce défaut.

Lorsque les cellules sont traitées au HU, les lignées HeLa Contrôles réduisent significativement leur vitesse de réplication en réponse à deux heures de traitement HU à 2mM, en revanche les lignées Cdk5 KD dont la progression de la fourche était déjà ralentie en absence de dommage ne ralentissent pas plus leur vitesse de réplication en présence de stress réplicatif, mais au contraire augmentent le nombre de fourches initiées en comparaison avec les lignées Contrôles. Ces résultats suggèrent que la protéine Cdk5 agit activement sur le point de contrôle intra-S.

Dans la levure mais aussi chez l'Homme, lorsque les kinases ATR, ou Chk1 sont inhibées, l'arrêt en phase S ne se fait pas correctement. En effet, l'activation d'ATR mais aussi de Chk1 sont nécessaires durant chaque phase S pour réguler l'activité des origines de réplication, favoriser la réparation de l'ADN et prévenir un passage précoce en mitose (Josse et al., 2014; Syljuasen et al., 2005). En absence de l'une de ces deux kinases, la cellule ne bloque plus les origines tardives en réponse au stress réplicatif (Poli et al., 2012; Santocanale and Diffley, 1998; Yekezare et al., 2013). Il a par exemple été montré qu'un traitement à la CPT entraîne une diminution de la vitesse des fourches de réplication ainsi qu'une inhibition de l'activation de nouvelles origines au sein de la même zone de réplication. Il a été montré que cette régulation était perdue lorsque l'on inhibe pharmacologiquement Chk1 ou lorsqu'on diminue son expression par interférence à l'ARN (Unsal-Kacmaz et al., 2007). De plus, le même défaut de régulation a été observé après traitement UV et extinction des protéines Tipin et Timeless, deux coactivateurs de Chk1. Ceci amène à la définition du concept de point de contrôle de l'élongation (Conti et al., 2007).

L'observation d'une densité de fourches augmentée en absence de Cdk5 suggère que cette kinase serait impliquée dans la répression des origines tardives en présence de HU. Cette hypothèse est appuyée par nos analyses de l'activation par phosphorylation des protéines impliquées dans cet arrêt du cycle : Chk1 sur la Ser 317, représentative de l'activation du point de contrôle de la phase S (Niida et al., 2007), la phosphorylation de la protéine RPA sur

les S29, S33, S4 et S8 (Anantha et al., 2007) et SMC1 sur la S966 (Schwab et al., 2010; Tomimatsu et al., 2009), après un traitement au HU de 1h, 6h et 12h à 2mM. En effet, ces événements ne commencent à apparaître dans les lignées HeLa Cdk5 KD qu'après six heures de traitement HU alors que dans les lignées Contrôles ils sont visibles dès 1h de traitement HU, indiquant un retard d'activation du point de contrôle en absence de Cdk5.

Un élément pouvant expliquer le défaut de point de contrôle en phase S serait la phosphorylation de RPA. En effet, nos résultats *in vitro* montrent que la kinase Cdk5 phosphoryle RPA sur trois sites différents : S23, S29 et S33. Les 2 premiers sites sont communs avec Cdk1 et Cdk2 (Dutta and Stillman, 1992; Fang and Newport, 1993; Niu et al., 1997; Treuner et al., 1999), mais semblent être phosphorylés de manière plus importante *in vitro* par Cdk5 (voir figure S3 de l'article) et la sérine 33 a été décrite comme étant phosphorylée par ATR (Binz et al., 2004). Les analyses par westerns-blots montrent également une réduction de la phosphorylation des sites S29 et S33 en réponse au HU, indiquant que Cdk5 pourrait effectivement phosphoryler ces sites *in vivo*. (1. la sérine 23 n'a pas pu être analysée faute d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée). Ces phosphorylations étant importantes pour l'activation d'ATR et pour la fonction de RPA dans la répression des origines tardives (Carty et al., 1994; Oakley and Patrick, 2010; Patrick et al., 2005), la diminution observée dans les cellules Cdk5 KD pourrait expliquer une partie du phénotype de ces cellules en réponse au HU. Pour confirmer ces données *in vivo*, nous avons tenté de purifier les complexe RPA/Cdk5 dans les cellules HeLa mais sans succès. La mesure de la phosphorylation de la protéine RPA dans les cellules à l'aide de phosphore radioactif n'est pas envisageable étant donné le biais possible lié à la capacité de Cdk1 et Cdk2 à phosphoryler RPA. Une autre approche serait de transfecter un plasmide RPA muté sur les sites S23, S29 et S33 dans les lignées Cdk5-KD, ces sites seraient remplacés par l'aspartate afin de mimer l'état phosphorylé de la protéine au niveau des sérines (Anantha et al., 2007), et d'analyser le phénotype en réponse au HU. En conclusion, notre modèle de travail est que la protéine Cdk5 agit sur le point de contrôle intra-S par la phosphorylation de la protéine RPA qui active la cascade de signalisation ATR-Chk1 (voir schéma Figure 25).

Une autre hypothèse à envisager serait que les lignées Cdk5 KD répondent au stress réplcatif par l'hyperactivation de la ribonucléotide réductase et de ce fait initient plus de fourches en présence de HU ce qui leur permettrait d'échapper au point de contrôle en phase S. Dans la levure *S.cerevisiae*, Poli *et al.* ont montré qu'un traitement au HU réduit la vitesse de réplication et les événements d'initiation des cellules sauvages alors que les mutants ATR et Chk1 présentaient un pool de dNTP augmenté, leur permettant d'effectuer la réplication en

situation de stress (Poli et al., 2012). L'observation d'une déficience du point de contrôle intra-S et d'une réduction de la phosphorylation de la protéine RPA dans les lignées Cdk5 KD traitées à l'aphidicoline, qui est une drogue induisant un stress réplcatif par son action sur l'ADN polymérase et non sur l'équilibre du pool de dNTP (Hustedt et al., 2013) ne sont pas en faveur d'un rôle de la kinase Cdk5 dans la régulation du pool de dNTP. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons commencé à analyser les profils de pool de nucléotides dans les lignées HeLa Contrôles et Cdk5 KD suite à un traitement au HU, les premiers résultats obtenus ne montrent pas de différence (voir annexe III).

Cependant, d'autres éléments du phénotype des cellules Cdk5 KD suggèrent que le défaut de point de contrôle pourrait s'expliquer par un autre rôle de Cdk5, en amont de RPA, il s'agit de la réduction du nombre de foyers RPA, après un traitement au HU de 24 heures dans les lignées Cdk5 KD en comparaison avec les lignées Contrôles. En effet, ceci suggère une formation d'ADN simple brin (ssDNA) moins importante en absence de Cdk5, ce qui conduirait à une activation moindre de la signalisation ATR dépendante. Cet effet pourrait être dû à un rôle de la protéine Cdk5 dans l'étape de résection, ou dans la stimulation de la formation de ssDNA en réponse au HU par une action sur le complexe hélicase/polymérase qui reste encore à caractériser. Les mécanismes qui permettent l'accumulation de ssDNA ne sont pas tous clairement identifiés (Zeman and Cimprich, 2014). Il a été montré que l'augmentation du niveau de ssDNA en réponse aux stress génotoxiques induits par les UV, le HU et le MMS dans les cellules de xénope, de levures et de mammifères (Michael et al., 2000; Sogo et al., 2002; Walter and Newport, 2000; Zou and Elledge, 2003), est due au découplage Hélicase/Polymérase (Byun et al., 2005; Zou and Elledge, 2003). Le ssDNA formé au niveau de la fourche de réplication est rapidement reconnu par la protéine RPA, ce qui active le point de contrôle intra-S en permettant le recrutement d'ATR aux sites de dommages et la phosphorylation de Chk1 (Zou and Elledge, 2003). Chez la levure, il a été montré qu'en réponse au stress réplcatif la mutation de la sous unité S3 de RPA qui permet la liaison avec l'ADN simple brin inhibe le ralentissement de la vitesse de réplication et que le mutant présente un point de contrôle intra-S déficient (Longhese et al., 1996). Les travaux récents de Martinez et al., sur les polyamides qui sont de petites molécules interagissant fortement avec l'ADN montrent que cette drogue induit un stress réplcatif qui se traduit par la formation de foyers PCNA, la phosphorylation de la protéine MCM, l'ubiquitination de la protéine FANCD2 et une accumulation des cellules en phase S. De façon très étonnante cette drogue n'induit pas pour autant une accumulation de ssDNA, ni la cascade ATR-Chk1, et ne génère pas de lésions double brin, contrairement aux traitements au HU et à l'aphidicoline.

Les auteurs présentent un modèle selon lequel un stress réplicatif modéré activerait ATR de manière non canonique, et que le passage d'un niveau de stress modéré à un niveau de stress persistant générerait une accumulation de ssDNA et activerait la cascade ATR-Chk1, les éléments favorisant cette balance restant encore à identifier (Martinez et al., 2015). Sur la base de nos observations, nous proposons que Cdk5, par un mécanisme qui reste encore à définir, stimulerait l'accumulation d'ADN simple brin qui représente le premier signal de l'activation du point de contrôle intra-S.

4. Cdk5 est nécessaire pour la survie aux agents génotoxiques : lien avec la réparation ?

Nos résultats de survie cellulaire après exposition aux rayons, au HU, au 5-FU ou à la 6-TG rejoignent ceux préalablement obtenus après un traitement à la CPT et au cisplatine (Tian et al., 2009; Turner et al., 2008), montrant que Cdk5 est requise pour la survie cellulaire à de nombreux agents génotoxiques, particulièrement en phase S. L'interprétation de ce phénotype est complexe car les causes de la mort cellulaire entraînant une diminution de la survie clonogénique peuvent être variées. Cette létalité peut être due notamment à: 1) une déficience des points de contrôle du cycle qui entraînent un passage trop rapide des cellules en mitose et de ce fait une instabilité génomique, 2) une déficience des mécanismes de réparation des cassures double brins (Huhn et al., 2013), 3) des anomalies de ségrégation des chromosomes ou (4) une réparation de cassures double brins infidèle (NHEJ dépendante), générant des réarrangements chromosomiques inappropriés (Calderon-Montano et al., 2014; Patel et al., 2011 ; Tubiana, 2008).

Il est de ce fait difficile de déterminer l'implication d'une protéine dans un de ces mécanismes par la seule utilisation de survies clonogéniques. En revanche ces expériences peuvent faciliter notre compréhension de l'impact de la déplétion d'une protéine sur la viabilité cellulaire et la réponse globale aux dommages, mais aussi sur l'impact d'un traitement chimio thérapeutique (Calderon-Montano et al., 2014). Dans la littérature, il est connu que l'inhibition des trois kinases essentielles à la réponse aux dommages et à l'initiation des cascades de signalisation, ATR, ATM et DNA-PK mais aussi de plusieurs de leurs partenaires et effecteurs Chk1, Chk2, Ku80, RPA et Claspin peut sensibiliser les cellules aux rayonnements ionisants mais aussi aux drogues de la réplication et aux inducteurs de stress oxydant. Cette sensibilité est due à leurs diverses fonctions dans les points de contrôles et dans la signalisation et réparation des dommages. Dans notre étude, nous avons montré que l'inhibition de Cdk5 sensibilise d'une part aux agents inducteurs de stress réplicatif mais aussi aux radiations ionisantes, ces deux stress bien que partageant les mêmes cascades de signalisation, requièrent ATM et ATR de manière temporellement différente. En effet, lorsqu'un traitement HU est induit dans la cellule, l'accumulation d'ADN simple brin active particulièrement la voie RPA-ATR-Chk1, qui active le point de contrôle intra-S et initie la réparation des cassures double brin induites en réponse au stress réplicatif, cette réponse dépend en partie du recrutement de la protéine

RPA sur le ssDNA (Shechter et al., 2004b). Dans le cas des rayonnements ionisants, les lésions induites sont différentes, et la voie ATM-Chk2 est favorisée dans une population non synchronisée (Cuadrado et al., 2006). Certaines modification des protéines requises pour la réponse au HU peuvent s'avérer ne pas être requise pour une réponse aux RI c'est le cas par exemple de l'hyperphosphorylation de la protéine RPA. En effet, il a été montré que les lignées MCF inhibés pour RPA étaient hypersensibles au HU alors qu'elle ne présentaient pas de sensibilité aux RI, cette différence serait due au fait que l'hyper phosphorylation de la protéine RPA sur les sérines S4S8 n'est pas requise pour la formation des foyers Rad51 en réponse aux RI, alors qu'elle semble nécessaire en réponse au HU (Shi et al., 2010)

Dans le cas de la protéine Cdk5, nous avons montré un retard et une réduction de la phosphorylation de RPA, et de la protéine SMC1 tout au long du traitement HU. Cette observation pourrait en partie expliquer la sensibilité des cellules au HU. En revanche, nous n'avons pas observé de réduction de la phosphorylation des cibles d'ATR après irradiation et ce, même en phase S, une des explications possibles serait que les doses d'irradiations utilisées lors de nos expériences n'étaient pas suffisantes pour l'activation d'ATR. Il a été montré que des doses de l'ordre de 10 à 20 Gy sont nécessaires afin d'induire la phosphorylation de la protéine RPA. L'autre explication possible serait qu'en absence de Cdk5 la cascade ATR n'est pas activée en réponse à la cascade ATM. En effet, le modèle d'activation de la protéine ATR le plus connu, repose sur les travaux de Myers et al., et Adams et al., qui ont montré qu'en réponse aux RI, l'activation de la kinase ATM permettait l'initiation de la résection par les protéines du complexe MRN, cette résection étant nécessaire à la formation d'ADN simple brin, qui est essentielle pour le recrutement de la protéine RPA et l'activation d'ATR (Adams et al., 2006; Myers and Cortez, 2006; Shiotani and Zou, 2009). ATR activé, est ensuite requise pour l'activation du point de contrôle G2/M après RI (Huhn et al., 2013; Liu et al., 2000), ce point de contrôle est altéré dans les cellules Cdk5 KD après un traitement au HU, à l'aphidicoline et après irradiation. Il serait de ce fait tentant de spéculer que la kinase Cdk5 serait requise pour l'étape de résection nécessaire au recrutement de la protéine RPA et à l'activation de la kinase ATR. Cette hypothèse est complètement cohérente avec nos observations précédentes d'un niveau de foyers RPA réduit dans les lignées Cdk5 KD après un traitement de 24 heures au HU (Figure 4 de l'article). Si cette possibilité est envisageable, une question reste posée : comment les cellules atteignent un niveau de phosphorylation de la protéine Chk1 comparable dans les lignées HeLa Cdk5 KD et les lignées Contrôles que ce soit en réponse aux rayonnements ionisants 30 min post irradiation (résultats complémentaires) ou après un traitement HU de 24 heures, alors que l'on observe

bien que les cellules échappent au point de contrôle G2/M ? En effet, même si la phosphorylation de Chk1 est retardée aux temps court de traitement au HU, contrairement à RPA et SMC1, phospho-Chk1-317 atteint un niveau de phosphorylation similaire à celui des lignées Contrôles après 24 heures de traitement. Il est tentant de penser qu'en réponse au RI la kinase ATM compenserait cette déficience d'activation d'ATR dans les lignées Cdk5 KD et qu'elle pourrait à phosphoryler Chk1, suite aux dommages induit par RI, ou suite au HU (mais à des temps tardifs ayant permis d'activer ATM (Chanoux et al., 2009)).

La sensibilité des lignées HeLa en réponse à la 6-TG est une autre observation intéressante, la 6-TG est un agent mutateur générant principalement des cassures simple brin réparées par MMR (Mismatch Repair). Mais certains travaux ont suggéré que la 6-TG génère des intermédiaires de réparation pris en charge par la recombinaison homologue, et que les cellules inhibées pour les protéines Rad51, ou BRCA1 sont hypersensibles au traitement à la 6-TG (Issaeva et al., 2010; Rajesh et al., 2011). Ces travaux rapportent que l'inhibition de Rad51 a pour conséquence une réduction des échanges entre chromatides sœurs qui est due à une mauvaise prise en charge de ces intermédiaires (Rajesh et al., 2011). Dans le cas des cellules HeLa Cdk5 KD, nous avons d'une part observé une sensibilité à la 6-TG mais aussi aux inhibiteurs de DNA-PK en absence de stress et en réponse aux HU et aux RI, d'autre part une réduction du niveau de foyers RPA, RPAS4S8, Rad51 et des échanges de chromatides (SCE) tous marqueurs de recombinaison homologue après HU. Cette hyperphosphorylation de la protéine RPA sur S4S8 qui fait suite à la phosphorylation des autres sérines et a été décrite comme dépendante de DNA-PK est nécessaire pour initier la réparation des cassures double brin à la fourche (Shi et al., 2010; Sleeth et al., 2007; Wu et al., 2005). La réparation de ces cassures est initiée par une première étape de résection qui permet la recombinaison homologue (Cruz-Garcia et al., 2014; Huertas, 2010). Ces résultats suggèrent un nombre d'évènements de recombinaison fortement réduit en absence de Cdk5. Et notre hypothèse là aussi, nous amène à la résection. En effet cette étape primordiale à la réparation par recombinaison homologue pourrait être déficiente dans les lignées HeLa Cdk5 KD (voir Figure 36).

De ce fait, nous spéculons que l'hypersensibilité à l'inhibiteur de DNA-PK est probablement due à 1) l'effet synergique de la phosphorylation de la protéine RPA par Cdk5 et DNA-PK, 2)- une hyperactivation du NHEJ, qui peut expliquer la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de PARP selon le modèle de Patel, et la résistance à la NCS qui induit des cassures double brin franches pouvant être prises en charge par le NHEJ. Nous avons également observé une phosphorylation de γ H2AX ainsi qu'une induction et une disparition des dommages détectés

par la technique des comètes similaires dans les lignées Contrôles et les lignées Cdk5 KD. L'observation d'une radiosensibilité exacerbée en phase S et l'ensemble des résultats obtenus après traitement au HU laissent penser que l'effet observé sur la survie après irradiation provient des cellules se trouvant dans la phase S du cycle au moment de l'irradiation. Les dommages induits au niveau de la fourche requerraient la présence de Cdk5, contrairement aux dommages induits d'emblée par les rayons dans les autres phases du cycle.

Si cette hypothèse se confirme, Cdk5 ne serait pas la première kinase à jouer un rôle dans la résection, puisqu'il est aujourd'hui connu que les kinases Cdk1 et Cdk2 sont toutes les deux impliquées dans ce mécanisme (Falck et al., 2012; Peterson et al., 2011; Tomimatsu et al., 2014; Truong et al., 2013).

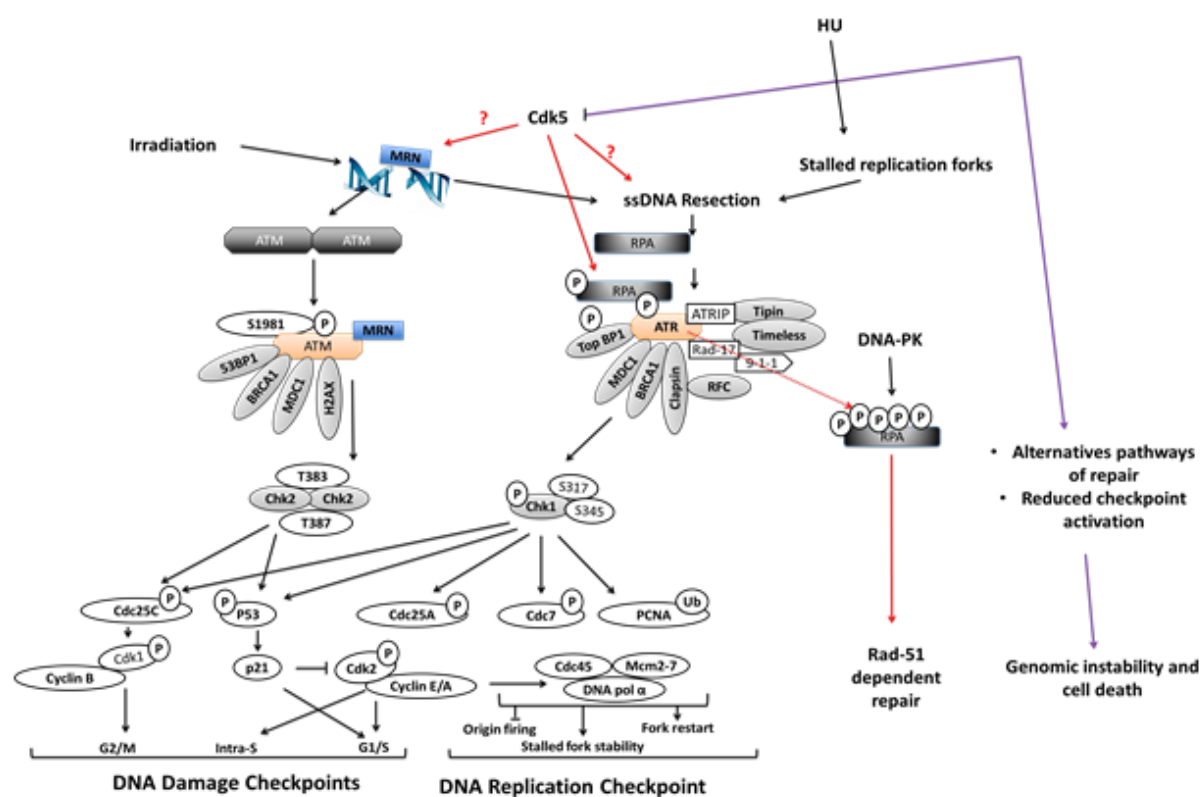


Figure 37: Modèle expliquant la sensibilité des lignées Cdk5 KD au stress génotoxique

Le stress génotoxique induit par les rayons gamma ainsi que le HU active les deux cascades de signalisation ATM et ATR, en absence de Cdk5, nous proposons que la phosphorylation de la protéine RPA ainsi que l'étape de résection serait réduites, entraînant une réduction de l'activation des points de contrôle et l'augmentation de la réparation par des mécanismes dit infidèles (NHEJ, SSA). Ceux-ci augmentent l'instabilité génomique qui est létale.

5. Cdk5 facteur de pronostic dans le cancer du sein

L'analyse de notre cohorte de 456 patientes ayant eu un cancer du sein (BC) a permis de quantifier le niveau d'expression de Cdk5 et de montrer qu'une expression plus faible de

Cdk5 est associée à un meilleur taux de survie sans métastases (MFS). Nos travaux sont en cohérence avec les travaux de Liang *et al.* qui ont analysé le niveau d'expression de Cdk5 par immunohistochimie dans un panel de 108 tumeurs du sein, et ont pu conclure que l'expression de Cdk5 était augmentée dans les cas de mauvais pronostic, mesuré par des marqueurs tels que le grade du cancer et le statut des récepteurs hormonaux. Un niveau d'expression de Cdk5 élevé serait significativement plus fréquemment présent dans les tumeurs du sein de grade III, mais aussi les tumeurs négatives pour les récepteurs aux œstrogènes, pour HER2⁺ et les tumeurs « basal-like » (Liebl *et al.*, 2011).

De façon plus globale, nos résultats sont en cohérence avec un constat général indiquant que la surexpression de la protéine Cdk5 est souvent associée à des capacités de prolifération et d'invasion des cellules tumorales importantes et ce dans plusieurs types de cancers, notamment la prostate, le pancréas, le poumon et le sein (Eggers *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014). Cela pose la question de savoir si l'inhibition de Cdk5 dans les tumeurs pourrait apporter un bénéfice thérapeutique. Pour le moment aucun des inhibiteurs de Cdk5 présent sur le marché pharmaceutique n'est spécifique de la kinase Cdk5, et de ce fait ce type de thérapie ciblée ne peut pas encore être envisagée. En revanche, une meilleure compréhension du rôle de Cdk5 pourrait permettre de cibler d'autres protéines associées à la kinase au cours du développement tumoral. Les travaux de plusieurs groupes mettent l'accent sur l'importance du rôle de Cdk5 dans l'adhésion cellulaire et la prolifération, ce qui semble être une piste intéressante (Eggers *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2013; Strock *et al.*, 2006).

Sur la base des résultats obtenus sur la cohorte de patientes BC et de nos résultats sur les différentes lignées déplétées pour Cdk5, une autre approche thérapeutique qu'il nous semble intéressante à envisager serait d'exploiter à la fois la létalité synthétique entre inhibition de Cdk5 et inhibiteurs de PARP et la sensibilité aux différents agents génotoxiques observées afin d'améliorer encore la réponse des tumeurs exprimant faiblement Cdk5.

Des inhibiteurs de PARP sont actuellement en essais cliniques en association avec la radiothérapie ou d'autres agents chimiques. La radiothérapie avait été montrée comme potentialisatrice de l'effet des inhibiteurs de PARP dans le glioblastome (Dungey *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2009), et plusieurs chimiothérapies ont également été décrites comme pouvant induire une synergie avec les inhibiteurs de PARP, notamment les agents alkylants tels que le cisplatine (Huang *et al.*, 2008; Palma *et al.*, 2009), les inhibiteurs de topoisomérase tels que la Camptothécine (Park and Cheng, 2005), ainsi que l'antimétabolite gemcitabine qui est inducteur de stress répliatif (Jacob *et al.*, 2007). Une étude réalisée par Levacques *et al.* va

dans le sens de la validité d'une telle approche. En analysant une base de données obtenues par analyse par puces à ADN de 12 902 patients atteints de différentes tumeurs, ils ont montré que certains types de cancers étaient plutôt associés à une surexpression de Cdk5, dont les lymphomes, cancers du sein, de la prostate, des ovaires, du poumon... et d'autres à une sous-expression, notamment les cancers du cerveau, de l'œsophage et les leucémies. L'analyse de la réponse des patients traités pour un myélome avec du bortezomib, qui est un inhibiteur du protéasome, montre que les patients présentant une faible expression de Cdk5 répondent favorablement au traitement avec un meilleur pronostic de survie (Levacque et al., 2012). Cette observation indique que dans ce cas les données obtenues avec des lignées cellulaires, qui montraient une sensibilisation au bortezomib après inhibition de Cdk5 semblent pouvoir être extrapolées au patient. Il est à noter que le bortezomib inhibe la transcription de plusieurs gènes de réparation impliqués dans la réparation par BER, NER et NHEJ (Mitsiades et al., 2003), il est donc probable que l'association de cet inhibiteur à l'absence de Cdk5 qui joue un rôle dans l'activation des points de contrôle intra-S et G2/M génère une forte instabilité génomique et la mort cellulaire. On peut faire l'hypothèse qu'une létalité plus importante des cellules tumorales va limiter le potentiel métastatique de la tumeur et le risque de récurrence.



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux menés au cours de ma thèse ont permis de mieux comprendre les rôles joués par Cdk5 dans les cellules non neuronales, d'identifier son implication dans la réplication et la progression normale des fourches et de préciser ses fonctions dans le point de contrôle intra-S. En effet, nos résultats démontrent que Cdk5 est requis pour l'activation du point de contrôle en phase S en situation de stress réplcatif, en réduisant la vitesse de réplication et réprimant les origines tardives. D'un point de vue moléculaire cette observation est due à l'importance de la kinase Cdk5 pour l'activation de la cascade ATR dépendante après HU. Par conséquent Cdk5 est nécessaire la phosphorylation de Chk1, SMC1 et RPA aux temps courts de traitement HU, à l'hyperphosphorylation de la protéine RPA et SMC1 après 24 heures de HU. Nos travaux ont également montré que RPA était un substrat direct de la kinase Cdk5 *in vitro*, et probablement *in vivo*, puisque nous avons également observé une réduction de de la phosphorylation de RPA sur ces les serines S29 et S33. Le modèle que nous proposons suggère que Cdk5 serait requise au cours du processus normal de réplication et en réponse aux dommages, pour la phosphorylation de la protéine RPA qui est nécessaire pour la cascade de signalisation, et nous proposons également que Cdk5 est requise pour la formation d'ADN simple brin, soit par une implication dans le mécanisme de résection, soit par une action sur le complexe hélicase/polymérase. Enfin nous proposons que Cdk5 est un marqueur de pronostic dans le cas des cancers du sein.

Il serait maintenant intéressant d'identifier les mécanismes précis par lesquels Cdk5 agit au cours de la réplication, et en réponse au stress réplcatif. Nos observations doivent également être confirmés dans un autre modèle cellulaire.

En réponse à un stress réplcatif

En réponse au stress réplcatif, il est nécessaire de faire des quantifications d'ADN simple brin par mesure indirect (immunofluorescence de BrdU en conditions non dénaturantes ou foyers RPA) après deux heures de traitement HU afin de comparer ces résultats à ceux que nous avons obtenus 24 heures post HU et de confirmer le rôle de la protéine Cdk5 dans la résection.

Les analyses des fibres ADN préparées par peignage moléculaire devraient également nous permettre d'analyser l'effet de l'absence de Cdk5 sur la répression des origines tardives suite à un court traitement au HU. Pour cette étude nous pouvons envisager de comparer les distances inter-origines dans les cellules positives ou négatives pour Cdk5 après traitement au HU.

Afin de déterminer au niveau moléculaire le rôle de la phosphorylation de la protéine RPA par Cdk5 dans le point de contrôle en phase S, il sera important d'étudier ces phosphorylations par une autre technique que les westerns blots. Il serait intéressant d'utiliser des plasmides exprimant une forme phospho-mimétique de RPA, l'expression de cette protéine nous permettrait de vérifier que le phénotype observé dans les lignées Cdk5 KD est restauré après expression d'une forme constitutivement phosphorylée de la protéine RPA.

J'avais au cours de ma thèse réalisé des test d'immunoprécipitation de la protéine RPA endogène à partir de lysats de cellules qui expriment Cdk5 et traités ou non au HU. La quantité de RPA immunoprécipité n'était pas suffisante pour nous permettre une analyse par spectrométrie de masse des sites de phosphorylation de la protéine RPA. Il serait envisageable de refaire cette expérience, en surexprimant la protéine RPA afin de faciliter la purification du complexe.

Conséquences sur la réparation

La résection ayant un impact direct sur la recombinaison homologue, il faudrait quantifier ces événements dans nos lignées HeLa. En plus de la détection des foyers RPA et Rad51 que nous avons déjà réalisée, il faudrait faire une détection au BrdU du ssDNA et idéalement utiliser la méthode plus quantitative et précise développée récemment par Zhou et al. (Zhou et al., 2014). Dans le but de déterminer si Cdk5 affecte la balance HR/NHEJ, nous pouvons poursuivre l'analyse par immunofluorescence de la formation de foyers des protéines impliquées dans le NHEJ (foyers XRCC4 et DNA-PK) et des protéines impliquées dans le HR (Rad51, BRCA1) en réponse aux RI et au HU dans les différentes lignées.

L'utilisation des tests plasmidiques qui mesurent le HR et le NHEJ, développés par l'équipe de Bernard Lopez (Guirouilh-Barbat et al., 2004) serait également envisageable.

Identification des partenaires de Cdk5 au cours de la réplication

Nous avons montré un ralentissement des fourches de réplication au cours de la progression normale en phase S des lignées Cdk5 KD. Afin d'identifier les partenaires de cette kinase, il serait envisageable d'utiliser la technique « Ipond » développée par l'équipe de Cortez qui consiste en une immunoprécipitation couplée à de la spectrométrie de masse qui permet d'identifier les protéines actives au cours de la réplication mais aussi après induction de stress (Sirbu et al., 2011). Cette technique nous permettrait de chercher les protéines interagissant avec Cdk5, avant et après traitement HU. Cette technique est d'autant plus intéressante que les travaux du laboratoire ont également montré un rôle de Cdk5 dans la régulation de

l'activité de PARP-1 (Bolin et al., 2012), l'immunoprécipitation des différentes protéines permettrait également de mesurer leur niveau de Parylation.

Cdk5, une future kinase cible de la thérapie

L'analyse de l'expression de Cdk5 dans une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein nous a permis de montrer que l'absence de Cdk5 pourrait être un bon marqueur de pronostic. Il faudrait confirmer ces données à l'aide d'une étude prospective. En perspective il serait très intéressant de développer un modèle murin dans lequel nous pourrions greffer des tumeurs avec des niveaux d'expression de Cdk5 variables afin de tester différentes associations de traitements (Radiation/ Inhibiteurs de PARP /drogues du stress réplicatif) et d'en analyser la réponse. Enfin le développement d'inhibiteurs devra être envisagé pour le traitement des cancers surexprimant Cdk5.

A thin vertical line runs down the left side of the page.

MATERIELS ET METHODES

Lignées cellulaires

Les clones HeLa Contrôles et HeLa Cdk5 KD ont été élaborés en collaboration avec le Dr.Denis Biard. Brièvement, la technique consiste en la transfection d'une lignée HeLa de manière stable avec un vecteur pEBV (Epstein Barr Virus), contenant des séquences shRNA (short hairpin RNA) dirigée contre l'ARN messenger qui code la protéine d'intérêt (Cdk5). Deux plasmides Contrôles ont également été générés, ces plasmides contiennent des séquences shRNA inefficaces, les lignées cellulaires dites « Contrôles » correspondantes seront nommées CTRL et shCTRL. L'utilisation d'un algorithme a permis déterminer les séquences de l'ARN messenger de Cdk5 à cibler pour l'extinction de l'expression de la protéine.

L'ensemble des plasmides contiennent une cassette de résistance à l'hygromycine, ainsi qu'une séquence promotrice dépendante de l'ARN polymérase-III qui permet la transcription du shRNA et l'extinction de Cdk5 *in vivo*. Le détail de l'établissement des clones est décrit dans les travaux du Dr Biard et de ses collaborateurs (voir (Biard, 2007; Biard et al., 2005)).

Deux lignées HeLa Cdk5 KD ont été établies avec les séquences cibles suivantes :

Hela Cdk5-1499 : séquence nucléotidique 703-721 de la protéine Cdk5 (NM_004935).

HeLa Cdk5-1500 : séquence nucléotidique 455-473 de la protéine Cdk5 (NM_004935).

L'ensemble des résultats présentés ci-dessous et des résultats soumis pour publication, représente la moyenne des deux clones Contrôles et des deux clones Cdk5 KD.

En plus des lignées HeLa, j'ai utilisé au cours de mes travaux d'autres lignées cellulaires, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Nom	BT549 (ATCC® HTB-122™)	HCC 1954 (ATCC® CRL- 2338™)	BT-474 (ATCC® HTB-20™)	U2OS (ATCC® HTB-96™)	HeLa
Individus	Femme, 72 ans Caucasienne	Femme, 61 ans Indienne	Femme, 60 ans Caucasienne	Femme, 15 ans Caucasienne	Femme, 31 ans Noire (Amérique)
Provenance	Tissu épithélial, glande mammaire (sein)	Tissus épithélial, glande mammaire (sein)	Tissu épithélial, glande mammaire (sein)	Tissu épithélial osseux	Tissu épithélial Col de l'utérus
Propriété cellulaire	Adhérentes	Adhérentes	Adhérentes	Adhérentes	Adhérentes
Type de cancer	Carcinome	Carcinome stade IIA, grade 3	Carcinome	Ostéosarcome	Adénocarcinome

Milieus de culture

HeLa : DMEM high glucose avec Glutamax, avec pyruvate (Invitrogen), 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen), 1% Pénicilline-Streptomycine (Invitrogen), Hepes 10mM (Invitrogen), Hygromycine 150 µg/ml final (Invitrogen).

U2OS : DMEM high glucose avec Glutamax, avec pyruvate (Invitrogen), 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen), Hépès 1M (Invitrogen), Hygromycine 150 µg/ml final (Invitrogen).

BT549 : RPMI, Glutamax (Invitrogen) 1% Pénicilline-Streptomycine, 10% Sérum de veau fœtal, bicarbonate de sodium (1.5 g/litre), 10 mM Hépès, 1mM pyruvate de sodium

HCC1954: RPMI, Glutamax (Invitrogen) 1% Pénicilline-Streptomycine, 10% Sérum de veau fœtal.

BT474: RPMI, Glutamax (Invitrogen) 1% Pénicilline-Streptomycine, 10% Sérum de veau fœtal, bicarbonate de sodium (1.5 g/litre).

Croissance et survies cellulaires

Afin de calculer la croissance cellulaire, les cellules sont ensemencées à 300 000 cellules/flacon en triplicat et comptées tous les jours pendant sept jours.

Pour les survies cellulaires, les cellules synchronisées ou non, sont ensemencées en triplicat pour chaque dose, dans des flacons de 25 cm². Entre 800 et 1600 cellules ont été ensemencées en fonction des lignées. Suite à l'ensemencement, les cellules sont incubées pendant quatre heures à 37°C. Puis elles sont traitées avec les différentes drogues ou irradiées. Suite au traitement, les flacons sont rincés deux fois au PBS avant remise de 8 ml de milieu et incubation environ 12 jours. La fixation des cellules se fait après rinçages des flacons au PBS dans une solution Ethanol 100% pendant 30 min. Les cellules sont ensuite colorées pendant 30 min avec une solution au commassie et rincées. Le comptage des colonies se fait sous loupe.

Cytométrie en flux

Marquage BrdU : Les cellules HeLa sont ensemencées à 1M de cellules par flacon, traitées aux Rayons gamma (irradiateur GSR_D1, ¹³⁷Cs) ou au HU (Sigma Aldrich) aux doses et concentrations nécessaires, les cellules sont ensuite marquées au BrdU (Sigma Aldrich) 15min et récoltées aux temps correspondants puis centrifugées et rincées au PBS et resuspendues dans une solution (20%DMSO, 80% DMEM). Les tubes peuvent ensuite être conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Afin de marquer l'ADN au BrdU, les cellules sont culotées puis suspendues dans 0.6 ml de PBS froid et fixées dans 1.4ml de méthanol 100% préalablement refroidi.

Au moins 24 heures après, les tubes sont centrifugés à 2800 rpm, 5 min, 4°C et rehydratés avec 2ml de PBS pendant 10 min, les cellules sont recentrifugées à 2800 rpm, 5 min et reprises dans avec 3 ml de solution de pepsine (Sigma Aldrich) (0,5 mg/ml, diluée dans de l'HCl 30 mM), les tubes sont incubés au bain marie à 37°C pendant 20 min, centrifugés à 2800 rpm, 5 min à température ambiante, repris dans 1,5 ml de HCl 2N et incubés à température ambiante (TA) pendant 20 min, 5 ml de PBS sont ensuite ajoutés à la solution et les cellules sont centrifugées 10 min à 2800 rpm.

Les culots sont bien resuspendus dans 1ml de Tampon-Bu (Sérum de chèvre 5 µl/ml (Dako France), Tween-20 : 5 µl/ml, Hépès 1M : 1/50 dans du PBS) homogénéisés et vortexés. 3 ml de Tampon-Bu sont ajoutés, les tubes sont ensuite centrifugés à 2800 rpm, 5 min, TA, les culots sont resuspendus dans 500µl de Tampon-Bu, homogénéisés et 20µl d'anticorps monoclonal anti-BrdU (BD Bioscience (347583) y sont ajoutés. Les tubes sont incubés 45 min-1h à TA, 5 ml de PBS y sont ajoutés et les tubes sont centrifugés 5 min à 2800 rpm. Les

culots sont resuspendus dans 200µl d'anticorps secondaire Goat anti-Rat-FITC (Clinisciences) dilué à 1/50. Après une incubation à TA pendant 30 min dans l'obscurité, 5 ml de PBS sont ajoutés et les tubes sont centrifugés 5 min à 2800 rpm. Enfin, les culots sont resuspendus dans 200-300 µl d'une solution d'iodure de propidium (PI) à 1/40 (Sigma Aldrich). L'analyse du marquage BrdU se fait au FACSCalibur cytofluoromètre (Becton-Dickinson).

Marquage Phospho H3 : Afin de calculer le ratio mitotique, les cellules sont traitées ou non avec du HU et transférées dans du milieu contenant 50 µg/µl nocodazole (Sigma Aldrich), les cellules sont ensuite récupérées au temps indiqués et conservés dans une solution 20% DMSO, 80% DMEM. L'immunomarquage avec l'anticorps anti-phospho H3 et l'analyse sont effectués comme décrit dans la publication de Fernet *et al.*, (Fernet et al., 2010).

Peignage moléculaire

Cette technique a pour but d'analyser la réplication. Pour cela, les fibres d'ADN sont étirées sur de fines lamelles de verre et les fourches de réplication sont marquées. Le protocole a été adaptée à partir de (Chabosseau et al., 2011; Michalet et al., 1997).

Les cellules asynchrones et non confluentes sont traitées ou non au HU pendant 2 heures puis marquées à l'IdU (Sigma Aldrich) à une concentration finale de 20µM, puis incubées pendant 30 min. Les cellules sont ensuite marquées directement et sans rinçage avec une solution de CldU (Sigma) à une concentration de 100µM final, les flacons sont homogénéisés et remis en incubateur pendant 30 min. L'idU et le CldU sont des analogues de la thymidine. Afin d'arrêter l'incorporation du CldU, les cellules sont incubées 5 minutes avec de la thymidine à une concentration de 1mM. Les cellules sont ensuite trypsinées et récupérées dans du milieu, lavées une fois dans du PBS froid et gardées à 4°C. Elles sont ensuite resuspendues dans du PBS froid à raison de 7,5 millions de cellules/ml. Le même volume d'agarose à bas point de fusion à 1% (Sigma Aldrich) préchauffé à 42°C est ajouté aux cellules. 80µl de ce mélange est utilisé afin de préparer des plugs, ces plugs sont digérés pendant 48 heures à une température de 42°C dans un mélange Protéinase K (Roche), SDS 1%, EDTA 0,25M. Afin de digérer les protéines cellulaires et libérer l'ADN, les cellules sont ensuite rincées pendant 20 min dans un tampon TE (Tris pH8 10 mM, EDTA 1mM) contenant 1mM de PMSF puis rincées deux fois avec la solution TE.

Suite au rinçage les plugs sont remis dans une solution contenant 280 µl de TE et 40 µl de tampon 10x β-agarase (New England Biolabs) et fondus à 68°C pendant 15 min. Les plugs sont ensuite digérés en trois fois avec 7,5 unités de β-agarase (New England Biolabs) (2,5

unité par digestion). Les trois digestions se font de façon continue : la première pendant 1 heure à 42°C et les deux autres pendant 24 heures à 42°C. A la fin de la troisième digestion 1,5 ml de tampon MES (Sigma Aldrich) (0.25M, Ph=5.5) sont ajouté délicatement, les tubes sont chauffés à 65°C pendant 30 minutes et réservés à 4°C pendant 15 jours en position horizontale (à ce stade, les fibres sont très fragiles).

Afin d'effectuer l'immunodétection des fibres, les tubes sont peignés sur des lamelles sylanisées (Génomik Vision) avec une machine à peignage (Génomik Vision), les lamelles sont ensuite chauffées dans un four à 60°C pendant deux heures et traitées pour l'immunodétection.

Les lames sont tout d'abord dénaturées dans une solution de NaOH 1M pendant 5min, à TA, rincées deux fois au PBS, puis dans une solution d'éthanol à 70% (5min) à -20°C, puis à 85% d'éthanol pendant 5min à TA, et enfin dans une solution éthanol à 100% (5min à RT). Les lamelles sont séchées et bloquées dans une solution de blocage (Block aid, Life Technologies). Les fibres peuvent ensuite être marquées par les deux anticorps : anti-BrdU FITC (souris, BD Biosciences-347583) à une dilution 1/5 qui permet de marquer l'IdU, et anti-BrdU (rat, Serotec-OBT0030) à une dilution de 1/25 qui permet de marquer le CldU et incubées pendant 1h à TA. Les lamelles sont ensuite rincées avec une solution de NaCl 0,5 M, Tris 20 mM pH 7,8, Tween20 0,5%) pendant 6 min à TA et incubées avec les deux anticorps secondaires : chèvre anti-souris Alexa 488 (Invitrogen-A11029) à une dilution de 1/50 et chèvre Anti-rat Alexa 594 (Invitrogen-A11007) pendant 30 min à 37°C. Elles sont finalement rincées trois fois au PBS pendant 5min à RT.

Le marquage des fibres d'ADN se fait par une incubation avec l'anticorps anti-ssDNA (Millipore-MAB3034) à une dilution 1/50 pendant 30 min à 37°C, les lamelles sont ensuite rincées trois fois au PBS pendant 5min à TA puis incubées avec l'anticorps secondaire : chèvre anti-souris Cy5.5 (Abcam-ab6947) à une dilution 1/100 pendant 30 min à 37°C et rincées au PBS trois fois 5 min à TA. Afin d'amplifier le signal, les lamelles sont incubées avec un deuxième anticorps secondaire : singe anti-chèvre Cy5.5 5 (Abcam-ab6951) à une dilution 1/100 pendant 30 min à 37°, rincées trois fois 5 min au PBS puis séchées entièrement avant d'être montées sur lames avec du ProLong® Gold (Life Technologies).

Acquisition et Analyse

L'acquisition se fait au microscope 3D à l'aide du logiciel Métamorph qui permet de prendre des mosaïques de 10x10 images à un grossissement de 45.

L'analyse des vitesses de réplication se fait par la mesure des fibres marquées IdU et CldU de chaque fourche entière et avec des extrémités ssDNA intactes afin d'être sûr que la fibre d'ADN n'est pas cassée et d'éviter un biais de mesure. La mesure des longueurs des fibres mesurées sur image J est convertie en kb par l'utilisation de la formule suivante : Pour le

Objectif 40X : $1 \text{ pixel} = (6,45 \times 1/40) \times 1 = 0,16125 \text{ } \mu\text{m}$

Peignage à 2kb/ μm : $0,16125 \text{ } \mu\text{m} = 0,16125 \times 2 \text{ kb} = 0,3225 \text{ kb}$

$1 \text{ pixel} = 0,16125 \text{ } \mu\text{m} = 0,3225 \text{ kb}$

La vitesse correspond à la mesure de (IdU+CldU)/60, la mesure des asymétries de fourche correspond au rapport IdU/CldU. Afin de comptabiliser la densité des fourches, j'ai calculé le nombre de fourche actives par fibre entière d'ADN non cassée (au moins 100 000 mb ont été comptés) puis ce nombre a été rapporté au pourcentage de cellules en phase S (mesuré par FACS).

Extraction protéique et westerns blots

Deux protocoles d'extraction ont été utilisés : l'extraction protéique des lignées HeLa et U2OS s'est faite par l'utilisation du protocole « Cell Signaling », l'extraction protéique des lignées issues de cancer du sein s'est faite par le protocole « Urée » détaillés ci-dessous :

Extraction « Urée »

Les cellules sont rincées au PBS froid et grattées dans 5 ml de PBS froid, centrifugées à 1500 rpm pendant 4 min à 4°C, puis resuspendues dans 1 ml de PBS. Les cellules sont alors centrifugées à 2000 rpm pendant 4min à 4°C et remises en suspension dans 100 à 300 μl de tampon UTB. Les cellules sont laissées dans la glace 15 min puis soniquées 3x5 sec puis remises dans la glace 15 min et centrifugées à 15000 rpm pendant 7 min. le culot peut être conservé à -80°C.

Composition du Tampon UTB : Urée 10M, Beta-mercaptoethanol 14,3M, Tris 0,5 M, Antiprotéases, et Antiphosphatases.

Extraction « Cell signaling »

Les cellules sont rincées au PBS froid et grattées dans 500 μl de tampon Cell Signaling froid, les extraits sont ensuite soniqués 3x5 sec puis chauffées à 95°C pendant 5min et centrifugés à 15000 rpm pendant 7 min. le culot peut être conservé à -80°C

Composition du Tampon Cell Signaling : Tris HCL 62,5 mM, SDS 2%, Glycérol 10%, DTT 50 mM, Bleu de bromophénol 0.01%, Antiprotéases, et Antiphosphatases.

La migration des échantillons protéiques a été effectuée sur un gel précoulé (BIO-Rad) contenant 4-15% d'Acrylamide ou préalablement préparés au pourcentage adapté au poids moléculaire de la protéine d'intérêt. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et après immunodétection, le signal est révélé soit par le système Odyssey soit par ECL. La quantification des bandes de westerns blot s'est faite à l'aide du logiciel Quantity one (Bio-Rad Laboratories), l'intensité des bandes a été normalisée par rapport contrôle de charge Actine ou Tubuline.

Immunofluorescence en phase S

Le principe de cette expérience est de marquer les différents foyers de réparation formés par les protéines Rad51 (Santa-cruz SC-8349), RPA (Pierce (MA1-26418), RPAS4S8 Bethyl (A300-245A) ou 53BP1(Abcam ab 21083) et de faire un double marquage au BrdU, afin de pouvoir quantifier uniquement les cellules en phase S. Une macro développée par la plateforme d'imagerie de l'Institut Curie a été utilisée pour la quantification des foyers. Le protocole est détaillé ci-dessous : les cellules sont incubées sur des lamelles, traitées ou non au HU, les cellules sont ensuite marquées au BrdU, (10 μ M, 30 min) aux temps indiqués sur les figures, les cellules sont fixées au PFA 1% pendant 10 min, perméabilisées au PBS 0,5% de triton pendant 5 min, puis rincées deux fois au PBS pendant 10 min, et bloquées 30 min dans une solution de PBS 1%BSA. Les lamelles sont ensuite incubées une heure avec les anticorps correspondants, puis rincées trois fois 10 min au PBS triton 0,5%, refixées 5 min avec du PFA 1% et rincées 2 fois 10 min au PBS. L'ADN est ensuite dénaturé avec une solution HCl 4N, NP40 2%. Les lamelles sont rincées au PBS trois fois 10 min et incubées avec l'anticorps anti-BrdU (Anti-BRDU-Flourescein, Roche-11202693001) pendant 30min, les lamelles sont finalement rincées 3 fois au PBS pendant 10 min, fixées avec une solution de PBS 1% PFA, et montées avec du DAPI 1.5 μ g/ml (Vector Laboratories).

L'acquisition des images se fait automatiquement avec un microscope SPINNING-DISC/TIRF/FRAP, (Nikon Ti Eclipse), sous l'objectif : 60x/1,48 et une tête de scanner confocale CSU Yokogawa. Les images sont capturées à l'aide du logiciel Metamorph (Molecular Devices) à l'aide de l'option « mosaic scan », au moins 500 cellules ont été capturées par condition. Les foyers sont ensuite analysés à l'aide d'une macro pour Image J, développée par Fabrice Cordelières (Plateforme d'imagerie, Institut Curie). Afin de ne quantifier que les foyers en phase S, une analyse des distributions d'intensité de BrdU est effectuée pour chaque lame et un seuil est déterminé en fonction de tous les temps analysés et en comparaison avec les pourcentages de cellules en phase S correspondants déterminés par

FACS. Seules les cellules considérées comme étant « BrdU positives » sont prises en considération pour la quantification des foyers de réparation.

Essais Kinases

Afin d'effectuer les tests kinases, la protéine recombinante RPA-32 (Abcam) est incubée 30 min à 30°C en présence de 0,5 ng de kinase active Cdk5, Cdk1 ou Cdk2 (Millipore) et 10 μ Ci [γ -³²P]-ATP. Ces protéines sont incubés dans solution tampon 1X préparé à partir d'une solution 10X composée de (1M MOPS pH 7, et 500 mM EDTA). La réaction est arrêté par l'ajout de 5 μ l de Bleu de bromophénol concentré 6x, les produits de réactions sont ensuite chauffés à 95°C pendant 5 minutes puis séparés sur un gel SDS-PAGE. L'analyse de la phosphorylation de la protéine RPA-32 est faite par autoradiographie. L'histone H1 a été pris comme contrôle positif.

Essais Comètes

Les essais comètes ont été effectués par la plateforme de radiobiologie de l'Institut Curie selon le protocole de (Rimmele et al., 2010).

Mesure de gamma-H2AX par FACS

La quantification de l'intensité gamma-H2AX par FACS a été faite comme décrit dans la publication de (Haddy et al., 2014). Les cellules sontensemencées à raison de 700 000 cellules par flacon de 25cm², traitées au HU puis remises dans un milieu contenant du nocodazole (afin de ne pas repasser en G1). Aux temps indiqués, les cellules sont trypsinées et conservées dans 20% DMSO 80% DMEM. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 1,6 ml de PBS froid et fixées dans 1,4 ml de méthanol 100% préalablement refroidi. Centrifugées et resuspendues dans du PBS froid à 0.25 % de triton et incubées 15 minutes dans la glace, les cellules sont ensuite resuspendues dans du PBS 3% BSA en présence de l'anticorps anti-phospho-histone H2AX-FITC (Euromedex (16-202A), dilué à 1/500). Les tubes sont incubés quatre heures à température ambiante. Les cellules sont enfin rincées dans du PBS 3% BSA et analysées par cytométrie de flux à l'aide d'un FACSCalibur (Becton-Dickinson). L'analyse a été faite à l'aide du logiciel FlowJo. La moyenne de l'intensité gamma-H2AX a été calculée pour chaque point.

SCE (Echange de Chromatides Sœurs)

Les cellules sontensemencées en plaque à raison de 180 000 cellules/puits et incubées en présence de BrdU 10mM durant un temps correspondant à deux divisions cellulaires (environ 40h pour les HeLa), les cellules sont ensuite traitées à la colchicine (100ng) pendant 1h à 37°C, les cellules subissent ensuite un choc hypotonique dans du sérum de veau fœtal dilué à 1/6 dans de l'eau pendant 30min à 37°C.

Les cellules sont ensuite fixées sur les lamelles dans un mélange d'acide acétique/méthanol 1/3 v/v) 15 min à TA, puis dans le mélange précédent dilué au demi pendant 5 min à TA. Les lamelles sont ensuite remises dans une solution d'acide acétique/méthanol 1/3 v/v pendant 30 min à TA puis 15min à 4°C. Les cellules sont ensuite colorées 20 minutes à TA à l'abri de la lumière dans une solution de Hoechst dilué au 1/1000 dans de l'eau (concentration finale : 10µg/ml) puis rincées dans du SSC 2X (dilué au 1/10). Les lamelles sont ensuite dénaturées pendant 1h45 sous une lampe UV à une longueur d'onde de 365 nm. Les cellules sont enfin colorées 16 minutes au Giemsa 2 %, rincées à l'eau, séchées puis montées sur lame avec une goutte d'Eukitt. Les chromosomes sont observés sous immersion à l'objectif 100X. Le nombre d'échanges par chromatide est compté à l'œil avec au moins 400 chromosomes comptés par condition et par expérience (Lahkim Bennani-Belhaj et al., 2010).

ANNEXES

Annexe I

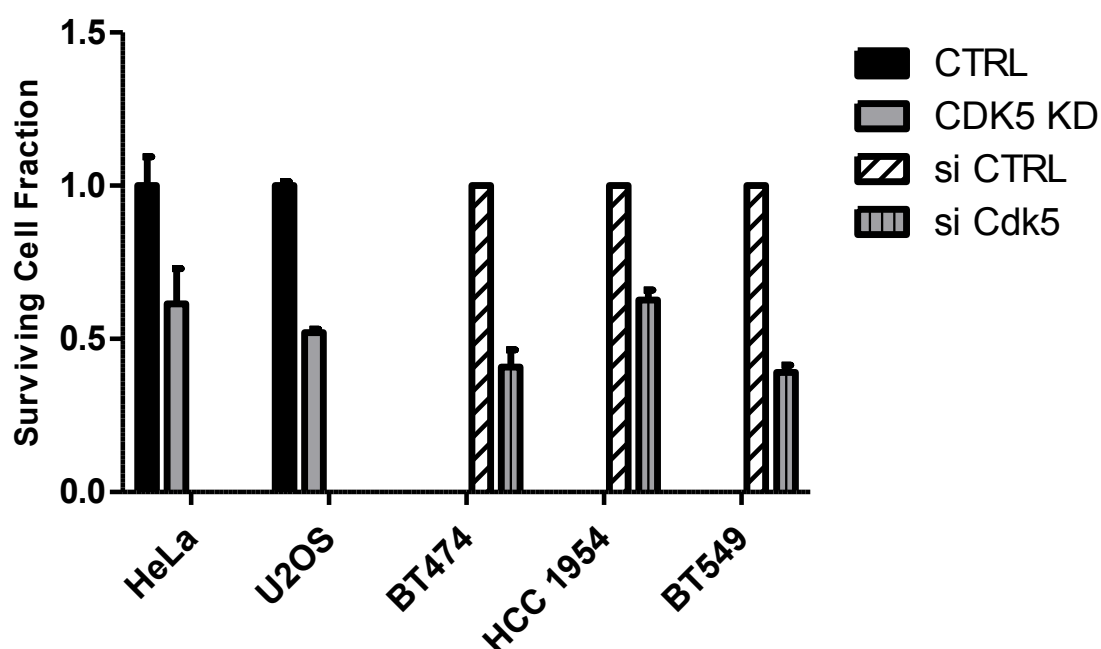


Figure 38: Survie clonogénique des lignées HeLa, U2OS et des lignées BC après inhibition de Cdk5

Les différentes lignées (HeLa, U2OS, BT474, HCC1954, BT549) sont inhibées par l'utilisation d'un shRNA ou d'un siRNA dirigée contre Cdk5. Les cellules sontensemencées puis transfectées avec le siRNA (dans le cas de BT474, HCC1954 et BT549).. Après 8 à 12 jours de croissance, les cellules sont fixées et comptées, les fractions de cellules survivantes (ratio siCdk5 vs siContrôles) sont calculées. Les données représentées sont la moyenne de 3 expériences réalisées en triplicat.

Annexe II

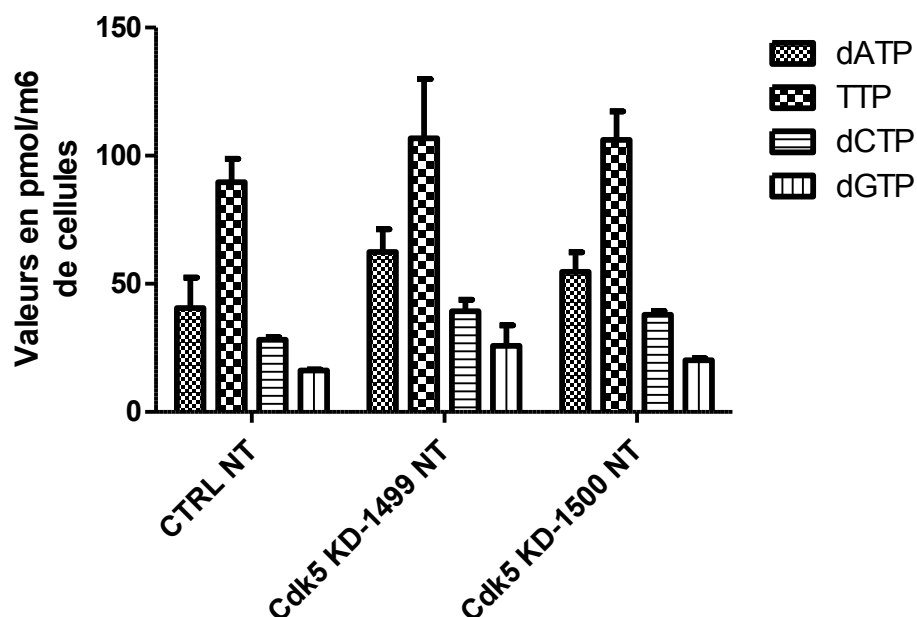


Figure 39: Effet de l'inhibition de Cdk5 sur le pool de nucléotide

Les cellules Contrôles ou Cdk5 KD sontensemencées, récoltées et analysées comme décrit (Machon et al., 2014). Les valeurs représentent la moyenne des triplicats d'une expérience.

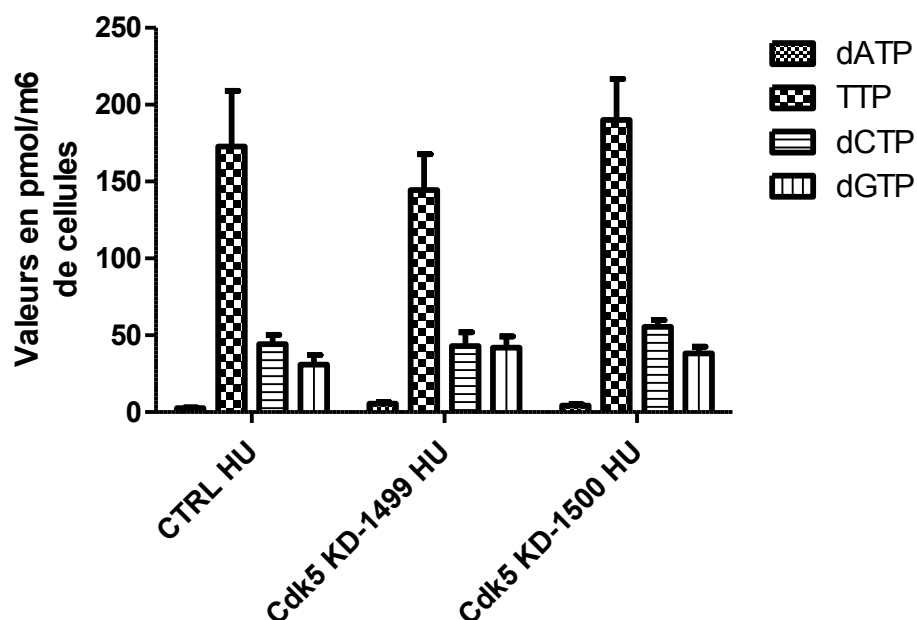


Figure 40: Effet de l'inhibition de Cdk5 sur le pool de nucléotide en présence de HU

Les cellules Contrôles ou Cdk5 KD sontensemencées, traités au HU (2mM, 24h) puis récoltées et analysées comme décrit (Machon et al., 2014). Les valeurs représentent la moyenne des triplicats d'une expérience.

Annexe III

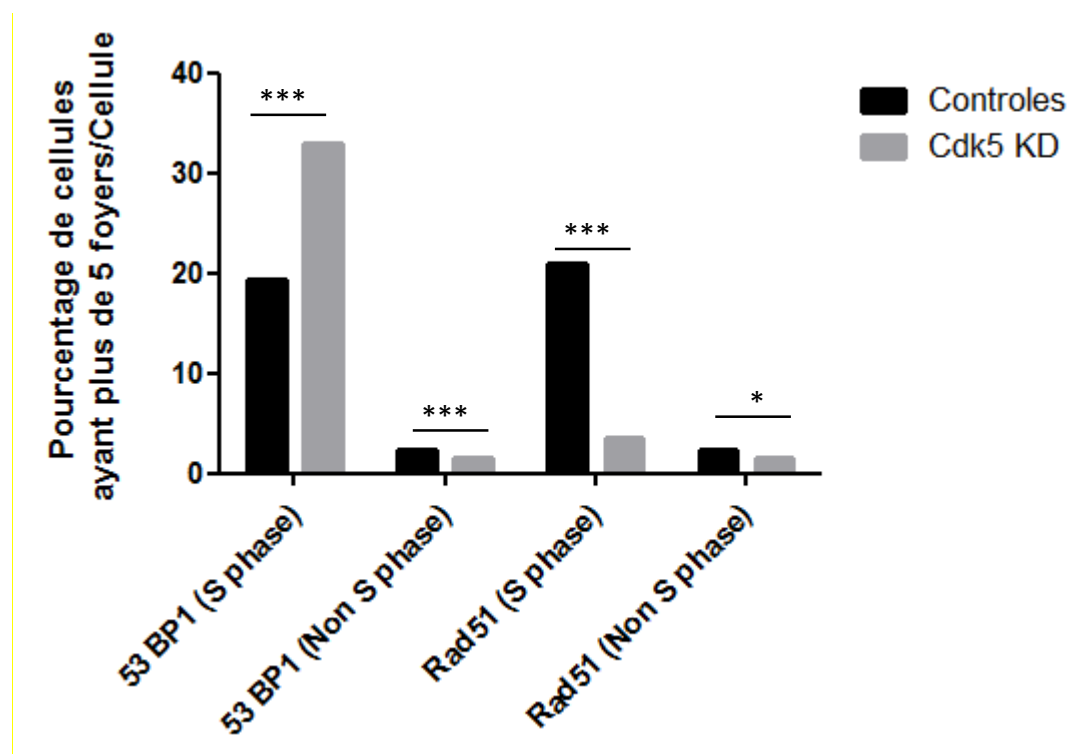


Figure 41: Quantification des foyers 53BP1 et Rad51 dans les lignées HeLa Contrôles et Cdk5 KD en absence de traitement

Les cellules non traitées sontensemencées et les foyers 53BP1 et Rad51 sont analysés en présence d'un double marquage au BrdU permettant de dissocier les cellules en phase S des cellules étant dans les autres phases du cycle cellulaire. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes pour 53BP1 et de quatre expériences indépendantes pour Rad51, avec deux clones différents. Entre 600 and 1000 cellules ont été analysées pour chaque condition. Les cellules ayant plus de 5 foyers Rad51 ou 53BP1 sont représentées. Les données ont été comparées par t-test (**P<0.001, *P<0.01).

Annexe IV

**ATM/ATR Cell Cycle Checkpoints: Mechanisms and Manipulation in
Cancer Therapy**

Marie Fernet^{1,2}, Sara Chiker^{1,2}, Janet Hall^{1,2}

¹ Inserm U612, Bats 110-112, Centre Universitaire, Orsay, 91405, France

² Institut Curie, Bats 110-112, Centre Universitaire, Orsay, 91405, France

Corresponding author: Janet Hall, Inserm U612, Institut Curie, Bats 110-112, Centre Universitaire,

Orsay, 91405, France

Tel : +33169863061

Email : janet.hall@curie.fr

INTRODUCTION

The importance of the efficient detection, signaling and activation of cell cycle checkpoints, particularly following the formation of lethal DNA double strand breaks (DSB) generated either directly for instance following exposure to ionizing radiation (IR) or indirectly during the processing of other DNA adducts or at stalled replication forks, is highlighted by the sensitivity to killing of cells in which the key players of these processes are absent or inhibited. The correct functioning of this DNA damage response (DDR) allows the cell time to repair damage or initiate cell death pathways (Fig. 1). Cancer cells often have defects in components of these damage signaling cascades or in cell cycle control, resulting in a greater dependence on the remaining functional processes. This can potentially be exploited to selectively increase the therapeutic effect of chemo- and radiotherapy in tumour cells by inhibiting the remaining intact DDR pathways and increasing cell death. Over the past decade significant effort has been directed to the development of small molecule inhibitors that target the major kinases involved in these pathways. This review will outline the roles of two key phosphoinositide-3 kinase like kinase (PIKK) family members, Ataxia-Telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3 related (ATR), which are involved in DNA damage detection and signaling, and of the checkpoint kinases Chk1 and Chk2, which participate in cell cycle control and checkpoint activation in response to DNA damage. We will also discuss the progress made in the discovery and development of selective inhibitors for these four kinases.

ATM AND ATR: THE MASTER KINASES IN THE DDR

Ataxia-Telangiectasia (A-T) is a rare autosomal recessive disorder associated with extreme radiation sensitivity, genomic instability and predisposition to cancer (Lavin and Shiloh 1997). The defective gene in A-T is the ATM gene, located on chromosome 11q22-23. It is composed of 66 exons and encodes a 13-kb mRNA, producing a protein of 3,506 amino acids with a predicted molecular mass of 350 kDa. The ATM protein is a serine/threonine kinase that has a fundamental role in the DDR through the phosphorylation of many effector proteins involved in the activation of cell cycle checkpoints, DNA repair and telomere maintenance.

The second important DDR kinase is the closely related ATR protein. The ATR gene is located on 3q22-24 and encodes a protein of 2644 amino acids with a predicted molecular mass of 220 kDa (Cimprich et al. 1996). The ATR protein is essential for the viability of replicating cells, and it is activated during every cell cycle to regulate replication origin firing and repair damaged forks. Disruption of the ATR gene results in an accumulation of DSBs during S phase, cell cycle arrest or apoptosis, as well as early embryonic lethality in mice (Lovejoy and Cortez 2009). No living humans have been identified that completely lack ATR function, but hypomorphic mutations in the ATR gene

are linked to Seckel syndrome which is characterized by growth retardation and microcephaly (O'Driscoll et al. 2003).

These two PIKK family members share a conserved C-terminal kinase domain structure with other kinases in this group, including DNA PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit), mTOR (mammalian target of rapamycin) and SMG1 (suppressor of mutagenesis in genitalia). The kinase domain is flanked on either side by two additional regions of sequence homology: the FAT (conserved sequence in FRAP, ATM, TRRAP) and the FATC (FAT C-terminal), which are involved in the regulation of PIKK kinase activity. The crystal and X-ray structure of this region determined for certain PIKKs would suggest that this tandem repeat is of functional significance for the regulation of protein kinase activity. This hypothesis is supported by the observation that mutations in these domains are associated with loss of kinase activity. The N-terminal regions of these kinases are less conserved, although ATM, ATR and DNA-PK all contain interspersed HEAT (Hungtingin, Elongation factor 3, alpha sub-unit of PP2A and TOR1) repeats that might be regulated by phosphorylation or other post-translational modifications such as acetylation and poly(ADP)ribosylation.

Other important protein-protein interaction domains are also found in the N-terminal region (for recent reviews, readers are referred to Bhatti et al. 2011 and references therein). In addition to these structural homologies, PIKK family members make use of analogous mechanisms for their interaction and recruitment to sites of DNA damage via “adaptor” molecules. Each PIKK has a “targeting” protein that contains a conserved interaction motif: NBS1 for ATM and ATR-interacting protein (ATRIP) for ATR. These interactions mediate the functions of the PIKK (Falck et al. 2005).

ATM/ATR ACTIVATION

Although ATM and ATR are related kinases and share many substrates, they are activated in response to different DNA structures at DSBs. ATR can be activated in response to a broader range of DNA damage that involves single-stranded (SS)–DS junctions. These structures most commonly arise when the replication fork encounters a DNA lesion due to the arrest of one polymerase while the other continues (see (Chen et al. 2011) and references there in), yet can also be generated by nucleotide excision repair or during resection of a DSB. Replication blocking causes DNA polymerases to become uncoupled from the replicative helicases, resulting in the formation of single strand breaks. These are quickly coated by the ssDNA binding protein complex, Replication Protein A (RPA) (Flynn and Zou 2011). ATRIP is indispensable for ATR activation and stabilization, as it binds directly to RPA and thereby enables the ATR-ATRIP complex to localize to sites of damage (Zou and Elledge 2003) (Fig. 2A).

Efficient ATR activation depends on the action of two mediator proteins, TopBP1 (topoisomerase (DNA) II binding protein I) and Claspin (Smits et al. 2010). The presence of RPA leads to the recruitment of the Rad17-RFC complex that loads the 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1) checkpoint clamp to the 5' recessed junction. TopBP1 is then recruited through interactions with phosphorylated ATRIP-ATR and phosphorylated RAD9 within the 9-1-1 complex. TopBP1's ATR-activating domain subsequently stimulates the kinase activity of ATR (Fig. 2A). Claspin, which probably also associates with active replication forks during normal replication, is then phosphorylated in a ATR-dependent manner within a short, repeated motif. Once modified, Claspin binds Chk1 and serves as a platform for ATR-dependent phosphorylation and thus Chk1 activation (Smits et al. 2010). It was shown that ATR is auto-phosphorylated on Thr1989 after exposure to hydroxyurea (HU), IR and ultraviolet (UV) light, and this phosphorylation could be a convenient biomarker of ATR activity. However, it should be noted that this phosphorylation is not essential for the ATR-CHK1 signaling axis following replication stress, but would appear to have some role in supporting cellular viability (Nam et al. 2011). The physical interactions between all these ATR partners are still being characterized. For instance Liu and colleagues have recently shown that phosphorylated Thr1989 is directly recognized by TopBP1, enabling TopBP1 to stably engage the ATR-ATRIP complex to efficiently stimulate the kinase activity and act as a scaffold for ATR-substrate interactions (Liu et al. 2011).

The ATM kinase is mainly activated in response to the formation of DNA DSBs. In the absence of DNA damage, ATM is believed to exist in an inactive homodimer, which in response to DNA damage is converted to an active monomer. The activation of ATM involves both auto-phosphorylation events (Bakkenist and Kastan 2003) and the Mre11: Rad50: NBS1 (MRN) complex (Lee and Paull 2005) (Fig. 2B). The MRN complex is also involved in the recruitment of ATM to DNA damage sites through the formation of a molecular bridge: Mre11 and Rad50 can directly bind DNA, whilst the NBS1 protein binds ATM via an interaction motif located in its N-terminus (Iijima et al. 2008). The auto-phosphorylation of ATM on Ser1981 is one of the earliest events detected in response to DNA DSBs, causing the dissociation of the inactive homodimer and allowing the active ATM kinase to circulate in the cell (Bakkenist and Kastan 2003). The importance of this auto-phosphorylation for the sustained localization of ATM at DNA DSBs has been demonstrated by following the recruitment of fluorescently tagged ATM, where the ablation of the auto-phosphorylation site negatively affects the ability of ATM to phosphorylate its downstream targets after DNA damage (So et al. 2009). Two additional (auto)phosphorylation sites on ATM, Ser367 and Ser1893, may also contribute to its activation (Lavin and Kozlov 2007). A number of other phosphorylation sites have been detected in ATM, suggesting that its activity can be modulated via other signaling kinases; for instance, CDK5 has been shown to phosphorylate ATM (Tian et al. 2009). It has been reported that once ATM is activated, the MDC1/NFBD1 (mediator of DNA damage checkpoint) protein becomes hyper-

phosphorylated and co-localizes with γ H2AX, 53BP1, and Mre11 foci (Lavin et al. 2005) (Fig. 2B). The recruitment of MDC1 to the site of damage increases the affinity of the MRN complex (through a direct interaction between MDC1-MRN), which ultimately stimulates ATM activity and stabilizes the kinase at the site of the lesion (Bartek et al. 2004). It should be noted that as for ATR, the full details of the molecular events surrounding ATM's activation and the down-stream signaling cascades are still being unraveled. For instance the contribution of the MRN complex to the different processes is complicated by the fact that all members of the complex are substrates for ATM and other PIKKs, suggesting considerable crosstalk at DNA DSB sites. In addition, changes in chromatin structure and histone remodeling are clearly involved in both activation and signaling, and there is considerable debate about the current models, which is outside the scope of this Chapter (readers are referred to a recent review on this issue (Bhatti et al. 2011)).

ATM/ATR SIGNALING

A multitude of proteins have been identified as ATM/ATR substrates. Indeed, a recent large-scale proteomic screen of proteins phosphorylated in response to DNA damage at ATM/ATR consensus sites identified over 700 proteins. These targeted proteins have a role in numerous cellular processes related to the DDR, including DNA repair, cell death and cell cycle control, with the serine/threonine kinases Chk1 and Chk2 being central effector proteins in these pathways (Bartek and Lukas 2003) (Fig. 3).

Chk1 and Chk2 activation occurs through distinct mechanisms: Chk1 activation is primarily downstream of ATR, whereas Chk2 is activated primarily by ATM. However, some experimental data supports the possibility that significant crosstalk takes place between the ATR-Chk1 and ATM-Chk2 signaling cascades (Stracker et al. 2009). In contrast to ATM and Chk2, ATR and Chk1 are thought to be active at low levels even during unperturbed cell cycles, particularly during S-phase, potentially explaining why they are essential in many cell types (Smith et al. 2010). Chk2 is a stable protein expressed throughout the cell cycle and appears to be largely inactive in the absence of DNA damage (Bartek and Lukas 2003), whilst Chk1 is a chromatin-associated protein with a shorter half-life that is active even in unperturbed cell cycles. Chk2-deficient mice are viable and do not have an increased risk of cancer, but Chk1-deficient mice are embryonic lethal.

THE ATR/CHK1 PATHWAY

Once an active ATR complex is assembled at a DNA lesion or stalled fork, signaling to coordinate cell cycle progression, repair, and replication begins. Activated ATR phosphorylates Chk1 on Ser317 and Ser345, leading to its activation. It would appear that the Ser317 phosphorylation is required for DNA

damage responses, whereas phosphorylation at Ser345 occurs even during the unperturbed cell cycle and is required for normal cell growth (see (Wilsker et al. 2012) and references therein). Chk1 activation by ATR also requires 9-1-1 complex loading by the Rad17-RFC complex, as well as several essential mediators including Timeless (Tim/Tim1) and Tipin (Timeless-interacting protein), which enable Chk1 phosphorylation on Ser317/345 by ATR. Timeless binds to both ATR and Chk1, whereas Tipin can interact with Claspin (Smith et al. 2010). ATR also phosphorylates a number of proteins involved in the stabilization of stalled replication forks and DNA repair, such as ATRIP, rad17, Rad9, TopBP1, Claspin, H2AX, WRN, BLM, BRCA1, and FANCD2, thus linking ATR to homologous recombination repair (HRR) and DNA cross-link repair in addition to cell cycle control (see Chapters Powell and Brosh) (Fig.3). In addition, some of these proteins are substrates for the activated Chk1 kinase, highlighting the complexity of the network that is involved in regulating the events in response to DNA damage. For instance, the mediator protein Claspin interacts with Chk1 in a damage specific manner that requires the phosphorylation of Claspin on at least two sites (Ser864 and Ser895) by ATR (Cimprich and Cortez 2008), as well as Chk1 mediated phosphorylation of Claspin on Thr916 (Stracker et al. 2009).

Following phosphorylation of Chk1 on residues Ser317 and Ser345, Chk1 dissociates from chromatin and localizes to the cytoplasm, where a portion localizes to interphase centrosomes. Chk1 then phosphorylates Cdc25s phosphatases, p53 and many other proteins involved in the control of cell cycle progression and cell cycle checkpoints induced by DNA damage. Currently, there is another model for the activation of Chk1 in which its phosphorylation (on the C-terminal serines) blocks intramolecular interactions, uncovering the N-terminal kinase domain (Dai and Grant 2010). Interestingly, Zhang et al. have shown that ATR-mediated Chk1 activation simultaneously targets this protein kinase for polyubiquitination and proteasomal degradation (Zhang et al. 2005).

As important as activation is the inactivation of DDR effectors, especially those involved in mitigating the cell cycle checkpoints that are transient processes. Chk1 has been shown to be negatively regulated by multiple serine/threonine phosphatases. Chk1 phosphorylation at Ser317 and Ser345 and Chk1 activity following DNA damage are regulated by PP1, PP2A and Wip1 (wild-type p53-induced phosphatase 1), which are phosphatases that play important roles in the recovery from DDR checkpoints (Freeman and Monteiro 2010).

THE ATM/CHK2 PATHWAY

As discussed above, the interaction of ATM with the MRN complex initiates a highly coordinated program of further recruitment of DDR proteins, promoting amplification of the DNA damage signal. This includes MDC1 binding to phosphorylated H2AX (γ H2AX) through its C-terminal BRCT

domain and to ATM through its N-terminal FHA (forkhead associated) domain, bringing more ATM to the DNA damage site (Cimprich and Cortez 2008). MDC1 also recruits RNF8, an E3 ubiquitin ligase that catalyzes the ubiquitinylation of H2A and H2AX, promoting the recruitment of 53BP1 and other proteins such as RNF168, BRCA1, CtIP and BRIT1/MCPH1 to DSB sites. H2AX phosphorylation by ATM occurs on mega-base regions surrounding DSBs within seconds of DNA damage formation. □H2AX plays an important role in anchoring the above proteins to the DSB and the flanking chromatin regions (So et al. 2009). □H2AX forms foci at and near the sites of DNA breaks, colocalizing with ATM, MDC1, 53BP1, BRCA1, the MRN complex, and many other DNA damage repair proteins (Bekker-Jensen and Mailand 2010). Chk2 and ATM jointly phosphorylate the BRCA1 tumor suppressor, leading to the dissociation of Chk2 from BRCA1, an important event required for efficient repair of the DSB and survival after exposure to IR (Fig.3).

In addition to initiating these events that will modify chromatin structure around the damage site and recruiting DNA damage repair proteins, ATM phosphorylates several other downstream effectors responsible for checkpoint controls, including Chk2. In the presence of DNA breaks, ATM directly phosphorylates Thr68 in the SQ/TQ cluster domain of the inactive monomeric Chk2. Phosphorylated monomers form dimers, allowing the autophosphorylation at Thr383 and Thr387 and other sites within the activation loop of the Chk2 kinase domain (Guo et al. 2010). These autophosphorylations increase Chk2 kinase activity, leading to the autophosphorylation at Ser516 in the C-terminal domain, which is required for the full activation of Chk2 (Ahn et al. 2000; Ahn and Prives 2002); (Wu and Chen 2003). Additional phosphorylation sites have been identified, but their role in regulating Chk2 activity is presently unclear (Antoni et al. 2007). Ubiquitination of Chk2 has also been reported and is controlled by the phosphorylation of Ser379 and Ser456. While both these sites are important for Chk2 function, they differentially affect the ubiquitination and stability of Chk2. Mutation of Ser379 impairs ubiquitination, but does not alter protein stability, whereas Ser456 mutation leads to a hyper-ubiquitination and Chk2 degradation (Stracker et al. 2009). Chk2 activity is regulated by the phosphatases PP2A and Wip1. These two phosphatases dephosphorylate Thr68 and probably other sites, and bind Chk2 in a Chk2 phosphorylation-dependent manner, providing a recovery mechanism from DNA damage (Freeman et al. 2010; Freeman and Monteiro 2010).

THE CONVERGENCE OF SIGNALLING PATHWAYS

Initially it was widely speculated that the ATM/Chk2 and ATR/Chk1 pathways act in parallel, but it has become increasingly clear that an overlap in substrate specificity exists for ATM and ATR, as for Chk1 and Chk2 (Smith et al. 2010). Most ATR substrates can also be phosphorylated by ATM, and the major functions of ATR and ATM in cell cycle control are overlapping and redundant. So why is one kinase not sufficient? A simple but incomplete answer to this question is that ATM and ATR

respond to different types of DNA damage: DSBs for ATM and replication stress for ATR (Cimprich and Cortez 2008). The DDR is however much more complex, as certain types of DNA damage can be converted to another, for instance, during replication. The ATM and ATR kinases clearly play a role in dealing with this dynamic situation. For instance, although ATR can respond directly and rapidly to interference with DNA replication, its activation at DSBs is dependent on ATM and is slower and predominately in S and G2 phases, as compared to the rapid activation of ATM by a DSB observed throughout the cell cycle (Jazayeri et al. 2006; Shiotani and Zou 2009).

While ATM/Chk2 and ATR/Chk1 pathways may be redundant for some functions (Fig. 3), each has specific roles as suggested by the differences between Chk1- and Chk2-deficient cells and mice. For example, deletion of a single Chk1 allele compromises G2/M checkpoint function, which is not further affected by Chk2 depletion, while Chk1 and Chk2 cooperatively affect G1/S and intra-S phase checkpoints (Niida et al. 2010). In addition, distinct roles for both proteins are suggested based on differences in their protein structure, cell cycle-dependent expression, timing of activation and stability (Bartek et al. 2001).

In addition to the convergence of signaling pathways activated by ATR and ATM, other pathways activated by DNA damage can feed into control of cell cycle progression. For instance, another effector kinase has been recently identified as a key player in some cell cycle checkpoints: the MK2 protein (MAPK kinase-2), which is activated by the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) p38 (Reinhardt and Yaffe 2009; Thornton and Rincon 2009).

CELL CYCLE CHECKPOINTS

A complex regulatory network that is conserved in most higher eukaryotes controls the cell cycle at multiple levels to ensure the proper timing of cell cycle phases, and in the presence of DNA damage, to activate cell cycle checkpoints. Of the four sequential phases of the cell cycle, arguably the most important are the S phase, when DNA replication occurs, and the M phase, when the cell divides into two daughter cells. Separating the S and M phases are two “Gap” phases, referred to as G1 and G2, in which the cell increases in size and prepares the chromosomes for replication or prepares for entry into mitosis, respectively. Progression through the cell cycle is driven by the cyclin-dependent kinase family (CDK) family of serine/threonine kinases and their regulatory partners, the cyclins, which are small proteins expressed and degraded at specific times during the cell cycle. Cyclin D-CDK4, Cyclin D-CDK6 and Cyclin E-CDK2 drive G1 progression through the restriction point, which commits the cell to complete the cycle. S phase is initiated by Cyclin A-CDK2, and Cyclin B-CDK1 regulates progression through G2 and entry into mitosis (Fig. 4).

CDK activity is tightly regulated at multiple levels through several mechanisms. These include the abundance of the regulatory cyclin subunit, their association with the catalytic CDK subunit, activating or inhibiting phosphorylation/dephosphorylation events, and the abundance of the members of two families of CDK inhibitory proteins (CKI). CKIs include two distinct families, the INK4 (INhibitors of CDK4) family, whose four members (p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d) exclusively bind to and inhibit the D-type cyclin-dependent kinases (CDK4 and CDK6), and the CIP/KIP family, whose three members (p21CIP1/WAF1, p27KIP1, p57KIP2) are able to inhibit the activity of all CDKs (Fig. 4) (Malumbres and Barbacid 2005). The main post-translational modifications of CDKs are their phosphorylation by the kinase CAK (CDK activating complex) on Thr160 (Lolli and Johnson 2005) and by Wee1 and Myt1 on Thr14 and Tyr15 that inhibits the kinase activity, and dephosphorylation by the Cdc25 phosphatases of the same amino acid residues, resulting in activation of the Cyclin-CDKs complexes. Progression through each cell cycle phase and transition from one to the next are monitored by sensor mechanisms, called checkpoints. Some are active during the unperturbed normal cell cycle to maintain the correct order of events, but in the presence of DNA damage, are activated to allow cells time to properly repair the damage, thus safeguarding the integrity of the genome (Niida and Nakanishi 2006).

The regulation of cell cycle progression in response to DNA damage shares with the DNA repair processes a common signal transduction response, involving the ATM/Chk2 and ATR/Chk1 signal transduction pathways. Activated, the signal transducers phosphorylate and promote the degradation or sequestration of effector Cdc25s, specialized phosphatases that activate the CDKs. The inactivation of the Cdc25s, as well as the accumulation of the effector protein p53 (see Chapter Lee), which is induced by its phosphorylation, leads to the arrest of the cell cycle progression. In addition to their role in the activation of the effector kinases Chk1 and Chk2, ATM and ATR have many other target proteins involved in the induction of cell cycle arrest that are independent of Chk1 and Chk2. The recently identified p38/MK2 pathway also seems to be important to establish certain checkpoints, with MK2 acting in parallel with Chk1 and Chk2 (Reinhardt and Yaffe 2009).

Cell cycle checkpoints exist at the G1/S and G2/M boundaries, preventing cells from replication or undergoing mitosis, respectively, in the presence of DNA damage. As DNA errors and lesions caused by endogenous or exogenous sources can be particularly harmful in S phase, multiple mechanisms, referred to as intra-S checkpoints, also exist to tightly regulate the progression of the replication fork. Cells deficient for these S phase checkpoints are not able to stop synthesis in the presence of DNA DSBs, as is the case for cells from patients with chromosome instability syndromes such A-T or Nijmegen breakage syndrome (NBS). In contrast to these checkpoints that are directly induced by DNA damage, mitotic spindle checkpoints are activated indirectly by sensing the consequences of the

damage, such as the incorrect alignment of the equatorial plane and/or impaired formation or attachment of the spindle fibers at the kinetochores.

In the following sections we will focus on the mechanisms and key players involved in the induction of the checkpoints and subsequent recovery, and give some indication of the limitations of these processes.

THE G1/S CHECKPOINT

The G1/S checkpoint is important to prevent cells damaged in G1 from entering S phase. To achieve this, introduction of DNA damage during G1 leads to the activation of signaling cascades that inactivate the Cyclin D-CDK4/6 and Cyclin E-CDK2 complexes that regulate S-phase entry via phosphorylation of pRb, which controls pRb binding to the transcription factor E2F. This checkpoint response has two kinetically distinct components. First the initial, acute phase operates by “locking” Cyclin E-CDK2 kinase in an inactive state through the inhibition/destruction of the activating phosphatase CDC25A. This is followed by a more delayed and sustained G1 arrest, mediated by the stabilization of the tumour suppressor p53 protein and the activation of its target p21, which is a CKI able to bind the two Cyclin-CDK complexes (Fig. 5). Of note, both components of this checkpoint response involve the ATM/ATR and Chk1/Chk2 kinases (Bartek and Lukas 2001).

THE P53-P21 AXIS

The p53 protein is a direct target of both the ATM/ATR kinases that phosphorylate Ser15 and the Chk2/Chk1 kinases that phosphorylate Ser20. These modifications of p53 lead to the disruption of its interaction with MDM2 that mediates the ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53 in non-damaged cells, and consequently, the amount of p53 protein in the cell increases. Other processes influence the regulation of p53 activity (see Chapter Lee), including other modifications of p53 itself and phosphorylation of MDM2 by ATM/ATR and the Chk1/Chk2 kinases. Furthermore, MDM2, by facilitating the nuclear export/inactivation of p53, becomes part of an inhibitory feedback loop (Meek and Hupp 2010). Once activated and stabilized, p53 affects the transcription of many genes, among them P21Waf1/Cip1. Transcriptionally up-regulated p21 binds and inhibits the Cyclin-CDK complexes. In addition, it has been reported that p38 MAPK can directly phosphorylate and stabilize p21 and thereby contribute to the G1/S checkpoint (Thornton and Rincon 2009). Inactivation of Cyclin D-CDK4 or CDK6 inhibits the phosphorylation of the tumour suppressor protein Rb. This results in the release of E2F transcription factor, thereby inhibiting the transcriptional activation of E2F-responsive genes essential for DNA synthesis, including Cyclin E and Cyclin A, which as a consequence are unable to activate CDK2 (Fig. 5) (Musgrove et al. 2011).

Another mechanism implicated in G1 checkpoint induction is the rapid degradation of Cyclin D1 after exposure to IR. This degradation leads to the release of p21 from Cyclin D-CDK4/6 complexes that in turn permits inhibitory binding to Cyclin E-CDK2. As this pathway involves transcriptional activation after post-translational modification, its full activation requires several hours and is assumed to be especially important for the maintenance of G1 arrest through the inhibition of Rb phosphorylation (Deckbar et al. 2011). At least transient inhibition of CDK2 in response to DNA damage occurs in cells lacking p53 or p21, implying the existence of another pathway that is p53-independent.

THE RESPONSE VIA CDC25A DEGRADATION

A p53-independent response occurs in the first hour following the introduction of DNA damage and is mediated by the inactivation of the phosphatase Cdc25A. This inactivation is regulated by several modifications, including phosphorylation of Cdc25A by Chk1 and Chk2 (Chk2 on ser123) (Mailand et al. 2000; Boutros et al. 2006). Such phosphorylation leads to Cdc25A's nuclear exclusion and ubiquitin-mediated proteolytic degradation by the proteasome. This results in persistent inhibitory phosphorylation of CDK2 on Thr14/Tyr15 and thus inhibition of the Cyclin E-CDK2 complex.

Recent work indicates that degradation of Cdc25A is regulated by phosphorylation by the Polo-Like Kinase 3 (PLK3) (Myer et al. 2011) and that p38 MAPK can also phosphorylate Cdc25A to promote its degradation (Thornton and Rincon 2009) (Fig. 5). Although the specific target(s) for Cdc25B and Cdc25C are not clear, some data indicate that these two isoforms cooperate with Cdc25A to promote S-phase entry (Boutros et al. 2006). The Cdc25A-mediated mechanism may contribute to genomic stability by imposing a cell cycle block and preventing excessive damage accumulation before the p53-p21 pathway ensures a more sustained proliferation arrest. Deregulation of either mechanism may cause genomic instability. The over-abundance of Cdc25A found in subsets of aggressive human cancers might prevent its timely degradation in response to DNA damage, and thus, provide a growth advantage through escape from the G1-S arrest and the propagation of genetic abnormalities (Mailand et al. 2000).

The major biological mission of DNA damage checkpoints is to allow time to repair the damage so that checkpoint-arrested cells can eventually resume cell cycle progression and continue their physiological program. Until recently, however, very little was known about the molecular basis of such checkpoint termination and recovery. Currently, the only described mechanisms that promote recovery are those responsible for recovery from the G2 checkpoint (see paragraph on G2/M checkpoints). Nevertheless, we know that the G1/S checkpoint is not permanent, as cells can be released from it, and that the duration of arrest increases with dose of damaging agent.

The G1/S checkpoint is highly sensitive to the presence of DNA DSBs (Huang et al. 1996), but two aspects compromise its efficacy: at early time points after irradiation, S-phase entry is slowed but not abolished and, once activated, G1/S arrest is inefficiently maintained, allowing cells with γ H2AX foci, a marker of DSBs, to escape from arrest and enter S phase. Both routes can lead to chromosome breakage in the subsequent G2 phase (Deckbar et al. 2010). More recently, Deckbar et al. showed that the G1/S checkpoint is induced after exposure to doses of IR as low as 100 mGy, that there is a dose-dependent response, and that the early Chk2/Cdc25 process is likely to be less sensitive at inhibiting CDK activity than the late p53/p21 process (Deckbar et al. 2011).

The major role of the p53 protein in preventing entry into S-phase has important consequences for tumour treatment (see Chapter Lee). Indeed, many cancer cells are deficient for p53 and fail to establish a G1 arrest in response to DNA damage, thus in these tumours, the G2 checkpoint has to be targeted for therapy.

THE INTRA-S CHECKPOINTS

Although the vast majority of cells in an adult organism are in G1 at any given time, damage occurring during S phase can interfere with the DNA replication machinery and lead to serious genomic abnormalities. Not surprisingly, cells have therefore developed mechanisms that detect DNA damage during S phase and transiently halt the firing of replicons still waiting to be replicated (Iliakis et al. 2003). There is a wider spectrum of DNA repair and checkpoint pathways available in S phase compared with the other cell cycle phases, and the precise nature of the cellular response in S phase and the ultimate fate of the responding cell depends, at least in part, on the identity and magnitude of the causative insult that threatens genome integrity.

The molecular mechanisms of S phase progression control are the least well defined of all the cell cycle checkpoints. However, responses can involve both active replication fork slowing and suppression of the replication origin firing (Grallert and Boye 2008). When DNA synthesis is blocked, additional replication checkpoint responses are required to stabilize stalled replication forks (fork stabilization) and delay the onset of mitosis until DNA replication is complete (S-M checkpoint) (Branzei and Foiani 2010; Smith et al. 2010). All these checkpoint responses are closely coordinated and share some components (Bartek et al. 2004). In response to DSBs induced by IR, at least two pathways are involved: the ATM/ATR-Chk1/Chk2-Cdc25A-CDK2 pathway and the NBS1-dependent pathway, which includes the ATM/NBS1/Smc1 and the ATM/Nbs1/FANCD2 pathways (Fig. 6) (Falck et al. 2002). Chk1 activation via ATR plays a dominant role in response to replication stresses (the replication checkpoint), but Chk1 is also required for amplification of a DSB-initiated Cdc25A signaling that is mediated by ATM/Chk2 (Conti et al. 2007; Dai and Grant 2010). Finally, we can

distinguish three distinct S phase checkpoints: the replication checkpoint and the S-M checkpoint, which both respond to problems with DNA replication and appear to be active even during unperturbed cell cycles, and the replication-independent intra-S checkpoint, induced by a DSB, on which we will focus next.

Defects in the intra-S checkpoint response to IR result in the inability of cells to reduce the rate of DNA replication when irradiated, a phenomenon that is known as radioresistant DNA synthesis (RDS). The assay for measuring RDS has become a “gold standard” to test whether or not any new candidate protein is required for the intra-S checkpoint. New techniques allowing the visualization of DNA replication at the single cell and single DNA molecule level will enable more detailed investigations into the regulation of elongation and fork velocity and their molecular effectors (Conti et al. 2007). For example, Conti et al. recently showed that the intra-S phase checkpoint consists of at least two main mechanisms: one operating on origin firing and the other on ongoing replication forks, with the contribution of the two mechanisms varying from organism to organism. The same checkpoint proteins have been suggested to control these two distinct mechanisms (Grallert and Boye 2008).

Given the growing number of proteins that are required for the proper activation and/or execution of the intra-S checkpoint, and thereby the prevention of RDS, the question arises as to whether all these proteins contribute to one of the two known effector branches of the checkpoint, or whether there are other downstream mechanisms that delay DNA replication. After exposure to a genotoxic stress such as IR, ATM is activated and phosphorylates several components of the intra-S checkpoint, including Chk2. A downstream target of Chk2 is Cdc25A, whose phosphorylation leads to proteolytic degradation by the proteasome in a process similar to that described above for the G1/S checkpoint. Degradation of Cdc25A will deprive the cell of an essential activator of CDK2, either in association with Cyclin A or Cyclin E, and will block replicon firing by inhibiting Cdc45 and other cellular targets (Fig. 6). The ATM/Chk2/Cdc25/Cdc45 axis forms a rapid response system. Interference with this cascade at any step downstream of ATM results in RDS. The role of Chk1 is more complex. It was shown that RDS after disruption of Chk1 correlates with the accumulation of non-degradable, hypo-phosphorylated Cdc25A (Iliakis et al. 2003) and that phosphorylation of Chk1 is a prerequisite for the IR-induced cascade to degrade Cdc25A (Sorensen et al. 2003). Experimental evidence suggests that Chk1 and Chk2 operate through the same mechanism and have a partially redundant role in the cascade.

The Nbs1-dependent branch is less well understood (Falck et al. 2002). It is initiated by the phosphorylation of NBS1 on Ser343 by ATM, an event that is required for the activation of the Nbs1-Mre11-Rad50 complex. Other targets of ATM and potentially ATR have been identified as being necessary for the proper execution of the intra-S checkpoint, including SMC1 and FANCD2.

Phosphorylation of Ser957 and/or Ser966 of SMC1 by ATM is required for the activation of the S-phase checkpoint in response to IR, and this modification is dependent on the phosphorylation of NBS1 by ATM (Yazdi et al. 2002). In addition, Taniguchi et al. showed that the ATM-dependent phosphorylation of FANCD2 on Ser122 is obligatory for the IR-induced S-phase checkpoint and is dependent on NBS1 and Mre11. How this phosphorylation establishes the checkpoint and if there is a functional link between the two downstream proteins SMC1 and FANCD2 remains to be established (Nakanishi et al. 2002; Taniguchi et al. 2002; Bartek et al. 2004). The mediator protein BRCA1 might also operate in the NBS1-dependent branch of the checkpoint, as its function is required for the checkpoint associated phosphorylation of SMC1. On the other hand, BRCA1, as well as the other mediator proteins, 53BP1 and MDC1, might contribute, possibly in a partly redundant manner, to the upstream events that amplify or modulate the activity of ATM and/or its interaction with the different substrates (Fig. 6) (Goldberg et al. 2003; Bartek et al. 2004). The effector mechanism through which the NBS1/SMC1/FANCD2 branch of the checkpoint inhibits DNA synthesis remains to be elucidated.

ATM and ATR are both required for maintaining replication fork stability and promoting the restart of collapsed replication forks. Furthermore, recent observations clearly show an involvement of the MRN complex activity in these processes, in an ATM-dependent manner (Garner and Costanzo 2009).

By contrast to cells in G1 or G2, cells that experience genotoxic stress during DNA replication only delay their progression through S phase in a transient manner, and if damage is not repaired during this delay, they exit the S phase and arrest later after reaching the G2 checkpoint.

THE G2/M CHECKPOINTS

A large majority of cancer cells that have defective p53 fail to establish a G1 arrest in response to DNA damage, but arrest in G2 instead, showing that apart from p53, additional mechanisms exist to prevent entry into mitosis with damaged DNA (Reinhardt & Yaffe, 2009). The cellular arrest that blocks progression from the G2 phase to mitosis after IR exposure was one of the first effects of radiation to be documented and investigated. It is the best defined of the cell cycle checkpoints, especially in terms of maintenance and recovery.

The G2/M checkpoint response is complex and can be mediated by a number of signaling pathways, including ATM, ATR and more recently the p38 MAPK pathway (Reinhardt and Yaffe 2009). G2 arrest is imposed by blocking activation of the mitotic Cyclin B-CDK1 complex by preventing the removal of the inhibitory Thr14/Tyr15 phosphorylation of CDK1, which was added earlier in the cell cycle by the kinases Myt1 and Wee1, respectively. This blockage is achieved, at least in large part, via the inhibition of Cdc25 family phosphatases, which play an important role in reversing the inhibitory

phosphorylation to rapidly activate the Cyclin B-CDK1 complex and trigger the onset of mitosis (Smith et al. 2010). Another pathway leading to Cyclin B-CDK1 inhibition that involves p53 has been described, but the exact function of this pathway in regulating G2/M arrest is not fully understood (Deckbar et al. 2011) (Fig. 7).

THE CDC25 PATHWAY

The Cdc25C phosphatase has a central role in the regulation of CDK1 activity; as a consequence, several pathways of regulation appear to converge here. Inhibition of Cdc25C is elicited by phosphorylation of Ser216 by Chk2 and Chk1. The inhibition is mediated by binding of the phosphorylated form of Cdc25C to the 14-3-3 protein, which renders Cdc25C catalytically less active and causes its sequestration in the cytoplasm, thereby blocking its interaction with Cyclin B-CDK1 (Iliakis et al. 2003). Cdc25C was the first Cdc25 phosphatase identified in the G2 checkpoint pathway, but all Cdc25s (A, B and C) shuttle between the nucleus and the cytoplasm in G2 and participate in Cyclin B-CDK1 activation (Lindqvist et al. 2009). Indeed, they can all be phosphorylated and bind to 14-3-3 protein, and thus, can be degraded following DNA damage in G2 (reviewed in (Boutros et al. 2006)). For example, some data show that Cdc25A is phosphorylated by Chk1, and this modification is required to prevent mitosis entry (Zhao et al. 2002). Notably, Cdc25A seems to be the only indispensable Cdc25 phosphatase for mitotic entry in mice (Ferguson et al. 2005).

Inhibition of Cyclin B-CDK1 can also be achieved by phosphorylation of Cdc25C or Cdc25B by the MK2 protein, which is a downstream effector of p38 MAPK. Although p38 is not directly phosphorylated by ATM, the activation of the p38/MK2 branch of the checkpoint has been reported to be ATM-dependent (Thornton and Rincon 2009).

When active, CDK1 activates Cdc25C, stabilizes Cdc25A, affects the localization of Cdc25B, and inhibits Wee1 and Myt1 kinases. Thus, via an inner feedback loop, Cyclin B-CDK1 can stimulate its further activation by directly activating its activators and deactivating its inactivators (Lindqvist et al. 2009). DNA damage also regulates CDK1 activity by regulating Cyclin B expression levels and subcellular localization (Iliakis et al. 2003). Additional regulation of Cdc25-CDK1 pathway is driven by two proteins of the PLK family, PLK1 and PLK3. PLK1 is activated by phosphorylation in an ATM-dependent manner and promotes mitotic entry by phosphorylation of Cdc25C. Initial phosphorylation of PLK1 is conducted by Aurora-A kinase, its activation being dependent on Bora (Strebhardt 2010), which is also activated by CDK1. In addition, Wee1 and Myt1 are targets of PLK1. These PLK1-dependent modifications constitute another feedback pathway to regulate Cyclin B-CDK1 activity (Lindqvist et al. 2009; Deckbar et al. 2011). PLK3 has been shown to phosphorylate Cdc25C, contributing to its sequestration in the cytoplasm (van de Weerd and Medema 2006).

There is evidence for an involvement of BRCA1 in the G2 checkpoint, either through ATM/ATR or possibly by directly activating CHK1 (Iliakis et al. 2003). It was shown that phosphorylation of BRCA1 on ser1423 by ATM is required for G2/M checkpoint induction (Xu et al. 2001), that BRCA1 is essential for activating Chk1, and that BRCA1 regulates the expression of Wee1 and the 14-3-3 family of proteins (Yarden et al. 2002; Yan et al. 2005). All of these mechanisms lead to G2 arrest through the regulation of CDK1 activity. In addition, BRCA1 can be phosphorylated by ATR and Chk2 (Deng 2006).

THE G2 CHECKPOINT MAINTENANCE

In order for cells to survive DNA damage, it is important that cell cycle arrest is not only initiated, but also maintained for the duration of time necessary for DNA repair. The existing data suggest that inactivation of a checkpoint response is an active process that requires dedicated signaling pathways. Long term CyclinB-CDK1 silencing for a sustained G2/M phase checkpoint requires transcriptional induction of endogenous CDK1 inhibitors (e.g. p21, Gadd45 and 14-3-3) via p53-dependent or p53-independent (e.g. via BRCA1) mechanisms that also involve Chk1.

Pathways such as those involving p53, which depend on changes in the transcription of target genes, act slowly and are mainly involved in checkpoint maintenance. Such a pathway, which involves the transactivation of CDK-inhibiting proteins, has a major role in controlling G1 arrest, but also contributes to the maintenance of the G2 checkpoint (Bunz et al. 1998). Smits et al. showed that p53-dependent activation of p21 results in the inhibition of Thr161 phosphorylation of CDK1, allowing G2 arrest to be sustained (Smits et al. 2000b). In addition, p53 can control the G2 checkpoint independently of p21 through transcriptional repression of mitotic inducers, including Cyclin B, Cdc25B and PLK1 (Medema and Macurek 2011a).

The p38/MK2 pathway was shown to be critical for long-term maintenance of the G2 checkpoint through phosphorylation and, as a consequence, activation of p53 (Thornton and Rincon 2009), and also through stabilization of p27Kip1, which can further suppress any residual CDK activity in case the DNA damage persists (Medema and Macurek 2011a).

CHECKPOINT RECOVERY

When DNA lesions are successfully repaired, cells re-enter the cell cycle in a process called recovery. The G2 checkpoint switch-off requires fully activated Wip1 phosphatase and PLK1 kinase, with depletion or inhibition of PLK1 completely blocking checkpoint recovery. To be fully activated, PLK1 needs to be phosphorylated at Thr210, an event that is carried out by the Aurora-A kinase together with its cofactor Bora in late G2, likely initially on centrosomes. To promote recovery, PLK1 targets the checkpoint mediator Claspin and the mitosis-inhibiting kinase Wee1 for ubiquitin/proteasome-

mediated degradation, phosphorylation of Myt1 and activation of Cdc25C (and probably Cdc25B) via its phosphorylation, which promotes nuclear translocation (Bartek and Lukas 2007; Medema and Macurek 2011a). An additional feedback loop is formed in which Cyclin B-CDK1 stimulates its own activation through stimulation of PLK1 activation (Lindqvist et al. 2009). In addition to these targets in or downstream of the ATR-Chk1 pathway, targets of PLK1 have been more recently described in the ATM-Chk2 pathway. Van Gut et al. showed that 53BP1 interacts with PLK1 and is phosphorylated by Cyclin B-CDK1 and PLK1, and that PLK1 phosphorylates Chk2, leading to the abrogation of their association and the inhibition of Chk2 kinase activity (van Vugt et al. 2010; van Vugt and Yaffe 2010). PLK1 also targets p53, where they physically interact, and phosphorylation of p53 by PLK1 inhibits its transactivation activity, including the induction of p21 (Ando et al. 2004; van de Weerd and Medema 2006). In summary, multiple feedback loops affect Cyclin B-CDK1 at several levels, ranging from direct activation to enhancing the concentration of mitotic entry network components through the regulation of transcription and specific recruitment to defined subcellular sites (reviewed in Lindqvist et al. 2009).

The activation of the PLK1-dependent pathways during checkpoint arrest counteracts the checkpoint pathways. PLK1 activity is essential but not sufficient for checkpoint recovery, indicating that additional control mechanisms exist. These pathways involved in G2 checkpoint termination act by counteracting the activity of the checkpoint kinases ATM and ATR, and engage protein phosphatases that remove phosphates from Chk1, Chk2, p53 and the damage signal amplifying histone variant H2AX (Freeman and Monteiro 2010). Multiple phosphatases participate in the inhibition of this DDR pathway, among them being PP1, PP2A and Wip1. Wip1 seems to play a central role because it specifically recognizes a p(S/T)Q motif, which is phosphorylated mostly by the ATM/ATR kinases. Among the many substrates of Wip1, p53 seems to have a special role in the G2 checkpoint recovery. Wip1 can regulate p53 by multiple mechanisms, including direct dephosphorylation, activation of Mdm2, which targets p53 for proteasomal degradation, and activation of MdmX, which directly inhibits the transcriptional activity of p53. This regulation is absolutely indispensable for recovery. Indeed, when cells depleted of Wip1 are treated with a DNA damaging agent, expression of Cyclin B (as well as a number of other cell cycle regulatory proteins) decreases below the minimal level required for recovery, due to an excessive activation of p53 (Medema and Macurek 2011a). P53 is also negatively regulated through direct dephosphorylation by PP1 and PP2A. Chk1 phosphorylation and activity are regulated by PP1, PP2A and Wip1, and Chk2 was found to be regulated by PP2A and Wip1 (Freeman and Monteiro 2010; Medema and Macurek 2011b). In addition, PP1 can dephosphorylate BRCA1 and ATM, ATR and Chk2 phosphorylation sites.

CELL CYCLE DEPENDENCE: TWO DISTINCT G2/M CHECKPOINTS

It is important to note that the network of interactions regulating progression through G2 after DNA damage is further complicated by the fact that the checkpoint mechanism will be determined by the phase of the cell cycle where the DNA damaging agent was used. Indeed, Xu et al. have shown, after exposure to IR, the existence of two molecularly distinct G2/M checkpoints : (1) the “immediate G2 arrest”, which is triggered rapidly in cells in G2 at the time of irradiation, is ATM-dependent (for doses above 0.5 Gy), transient and dose-independent (for doses above 2 Gy) and is characterized by an abrupt reduction in the mitotic index, and (2) the “ G2 accumulation”, which affects cells that reach G2 after traversing S-phase and develops over many hours, is ATM-independent, dose-dependent and reflected by an accumulation of cells in G2 (Xu et al. 2002; Fernet et al. 2010). The underlying mechanisms for either checkpoint response are not fully understood. The experimental data suggest a more stringent requirement for ATM-dependent DSB processing for rapid and efficient checkpoint activation in G2 than in S phase, but there is a lack of understanding of the relative contribution of ATM/Chk2 and ATR/Chk1 (and p38) signaling pathways to control the G2 to M transition. Whether one kinase is able to compensate for the other, or if the role of each simply varies as a function of cell type and/or type of DNA lesion is not yet well understood (discussed in Smith et al. 2010).

LIMITATIONS OF THE G2/M CHECKPOINT

Some studies demonstrated that tumour cells can divide in the presence of unrepaired DBSs several hours after IR and G2/M checkpoint activation, suggesting that the phenomenon described in yeast and *Xenopus* called “adaptation” may exist in human cells. More recently, it has been shown that mitotic entry in the presence of unrepaired DSBs represents a physiological process that occurs even in non-transformed cells. While one single DSB is enough to induce the G2/M checkpoint, it is abrogated in the majority of cells when they harbor between 10-20 unrepaired DSBs. Thus, although being rapidly activated (in contrast to G1/S checkpoint), the G2/M checkpoint also has inherent insensitivity (Deckbar et al. 2011). In addition, a dose higher than 0.5-1 Gy is needed to fully initiate the G2/M checkpoint.

THE MITOTIC CHECKPOINTS

A number of checkpoint proteins, including ATM, ATR, BRCA1, Chk1, Chk2 and p53, have been detected at centrosomes, which are the organizing centers for the microtubules, and notably, there is increasing evidence that CDK1 activation needs to be coordinated with centrosomal processes to start mitosis (Golan et al. 2010). It has been shown that Cdc25B is phosphorylated by the aurora-A kinase at the centrosome upon entry of cells into mitosis; this phosphorylation is Chk1-dependent and results in the activation of CDK1 (Cazales et al. 2005). Such events, occurring at centrosomes, are thought to be important in initiating recovery from the G2/M checkpoint and progression into mitosis. Thus,

checkpoint proteins at the centrosomes could serve as points of cross-regulation for the DDR and mitotic spindle processes (Golan et al. 2010).

During unperturbed mitosis, the spindle assembly checkpoint (SAC or mitotic checkpoint) ensures that chromosome segregation is correct by preventing anaphase onset until all chromosomes are properly attached to the spindle. Many DDR proteins, such as ATM, Chk1, Chk2, BRCA1 and BRCA2, have been reported to participate in this checkpoint as well (Yang et al. 2011a). Compared with the DNA damage responses during G2, considerably less is known about these responses during mitosis. How exactly mammalian cells respond remains a contentious issue, and the link between the SAC and the control of mitosis progression after DNA damage remains unclear. Smits et al. reported that DNA damage in mitotic cells induces a mitotic exit block via an ATM-dependent inhibition of PLK1 (Smits et al. 2000a), and more recently, activity of PLK1 has been shown to be regulated by the phosphatase PP2A in an ATM/ATR-dependent manner. Moreover, inactivation of PLK1 seems to lead to an increase of cells in G2 after DNA damage in mitosis, suggesting that prometaphasic cells might revert and remain in G2 (Chow et al. 2003; Jang et al. 2007). Data from Mikhailov et al., however, has shown that extensive damage is required to delay the exit from mitosis and that this delay is not due to an ATM-mediated DNA damage checkpoint pathway, but occurs via the SAC (Mikhailov et al. 2002). In addition, DNA damage signaling has been found to be reduced in mitotic cells, with full activation only ensuing when a DSB-containing mitotic cell enters G1 (Giunta et al. 2010). In contrast, Huang et al. showed that DNA damage does not just delay mitotic exit, but blocks it, leading to mitotic catastrophe, and that in BRCA1- or Chk1-deficient cells, this DNA damage checkpoint is compromised (Huang et al. 2005). It is thus tempting to speculate that the mechanisms controlling the mitotic progression in the presence of DNA damage may be dependent on the type and level of DNA damage. More investigations are required to clarify this question, but clearly ATM/ATR and Chk1/Chk2 are implicated in these processes.

TARGETING ATM/ATR PATHWAYS IN THERAPY

As discussed above, the PIKK protein kinases ATM and ATR and their down-stream effector proteins Chk1 and Chk2 control many aspects of the DDR, making them important targets for drug development for the treatment of malignant tumours. The over-arching rationale for such drug development is that the induction of DNA damage by chemotherapeutic drugs or radiotherapy in conjunction with the inhibition of DNA repair and/or cell cycle control in rapidly proliferating cells will result in increased cell death. Cancer cells often have defects in components of these signaling cascades, resulting in a greater dependence on the remaining functional processes. For instance, TP53 is mutated in many human cancers (Olivier et al. 2010) and homologous recombination repair is often found to be defective in certain genetic backgrounds through mutations or epigenetic silencing

(Cerbinskaite et al. 2012). Such deficiencies in tumour cells can be targeted using approaches such as synthetic lethality, where a drug or combination of drugs will cause the death of the tumour cell, while sparing proficient cells (see Chapters Powell and Curtin). Significantly, there is emerging evidence that checkpoint kinase inhibitors will have single-agent activity in cancer cells with specific defects in DNA repair (see (Garrett and Collins 2011; Ma et al. 2011) for discussions on these issues).

SMALL MOLECULE INHIBITORS OF ATM AND ATR

As reviewed by Bolderson et al., the first evidence that ATM might be an attractive target for chemotherapy was that cells from A-T patients are exquisitely sensitive to radiation and that the nonspecific PIKK and PI3K inhibitors wortmannin and caffeine increase cellular sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs (Bolderson et al. 2009). Unfortunately, both compounds lack specificity, and caffeine cannot be administered at high enough doses for use in therapeutic settings. By screening a combinatorial library based around the nonspecific PI3K and DNA-PK inhibitor LY294002, a highly specific small molecule ATP competitive inhibitor of ATM, 2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one (named KU-55933), was identified (Hickson et al. 2004). The IC₅₀ for KU-55933 is 12.9 ± 0.1 nmol/L. Counter-screening this molecule against other members of the PIKK family demonstrated that KU-55933 exhibits at least a 100-fold differential in selectivity, and at a single point concentration of 10 μ mol/L KU-55933, did not significantly inhibit any of the 60 kinases in a commercially available test panel. This inhibitor can efficiently sensitize a number of cell types, including human melanoma cells and prostate cancer cells, to the cytotoxic effects of IR and to DNA DSB-inducing chemotherapeutic agents, such as camptothecin and etoposide (Hickson et al. 2004; Ivanov et al. 2009; Shaheen et al. 2011). An improved analogue of KU-55933 (KU-60019) with Ki and IC₅₀ values half of those of KU-55933 has been reported that is 10-fold more effective than KU-55933 at blocking radiation-induced phosphorylation of key ATM targets in human glioma cells (Golding et al. 2009). Rainey et al. have also reported the development of another non-toxic rapidly reversible inhibitor of ATM function, CP466722. Using clonogenic survival assays, they showed that transient inhibition of ATM using this inhibitor was sufficient to sensitize cells to IR, suggesting that therapeutic radiosensitization may only require ATM inhibition for short periods of time (Rainey et al. 2008). There are also some indications that inhibitors of the ATM-mediated DDR may sensitize cells that are deficient in other repair pathways. For instance, Kennedy et al. showed that Fanconi anemia (FA) pathway-deficient tumour cells (see Chapter Brosh) were hypersensitive to the loss of ATM and that FA complementation group G- (FANCG-) and FANCC-deficient pancreatic tumor lines were more sensitive to the ATM inhibitor KU-55933 than the isogenic corrected lines (Kennedy et al. 2007). Such observations and the findings that FA genes are disrupted in a range of cancers (Valeri et al. 2011) may open up new therapeutic options, including ATM inhibitors for specific subsets of cancers. However, to date, no ATM inhibitor appears to have entered into clinical trials.

Preclinical studies investigating the impact of ATR inhibition have been hampered until recently by the lack of ATR specific inhibitors. ATR kinase activity is also inhibited by caffeine and wortmannin but, as discussed above, both agents inhibit multiple PIKKs. The natural product, schisandrin B, which is commonly used in traditional Chinese medicine for the treatment of hepatitis and myocardial disorders, is slightly more specific for ATR, but additional studies are required to determine the clinical feasibility of using schisandrin B as a sensitizing agent for anti-cancer therapy (Nishida et al. 2009) Chen et al. (Chen et al. 2011) have recently reviewed the progress in the development of novel small molecule ATR inhibitors and the findings that two agents designed to inhibit other kinases are in fact efficient ATR inhibitors: the inhibitor NU6027, originally designed as a CDK2 inhibitor, was more efficient at inhibiting cellular ATR activity (Peasland et al. 2011), and Toledo et al. showed that NVP-BEZ235, a dual PI3K and mTOR inhibitor that is currently in phase 1/2 clinical trials for advanced solid tumours, is also very potent against ATM, ATR and the catalytic subunit of DNA-PKcs (Toledo et al. 2011). In addition, Mukherjee et al. have reported cross-inhibition of ATM and DNA-PKcs by NVP-BEZ235 that is associated with a very high degree of radiosensitization (Mukherjee et al. 2012). As these authors discussed, this cross-reactivity may have important clinical implications in such that combining the drug with certain genotoxic chemotherapy could result in systemic toxicity and limit therapeutic gain. On the other hand, radiotherapy, like surgery, is a local treatment, and its efficacy could be significantly enhanced by the use of potent radiosensitizers, such as NVP-BEZ235, while minimizing normal tissue toxicity.

CHK1 AND CHK2 INHIBITORS

The first small molecule inhibitor used to investigate the impact of Chk1 and Chk2 inhibition was the staurosporine inhibitor UCN-01. Treatment with this compound led to G2/M checkpoint activation in IR-treated p53-deficient tumour cells (Graves et al. 2000), suggesting that the inhibition of these checkpoint kinases could be a promising therapeutic approach in p53-deficient tumours. UCN-01 has been tested in Phase I trials either as a single agent or in combination with a variety of chemotherapeutic agents (see Table 1 and references therein). Results indicate that UCN-01 has disappointing pharmacokinetic profiles and limited antitumour effects. In addition, UCN-01 inhibits several other kinases, including CDK1 and CDK2, complicating the mechanisms of action, as inhibitors of these checkpoint kinases would induce a cell cycle arrest, as opposed to the checkpoint abrogation produced by Chk1 and Chk2 inhibition. Such events may be responsible for some of the normal tissue toxicity seen in Phase I clinical trials, such as the increased myelo-suppression when used in combination with topotecan compared to topotecan alone (see (Ma et al. 2011) and references therein). However, the promising preclinical results obtained with UCN-01 spurred the pharmaceutical industry to develop and characterize more potent and kinase specific inhibitors. Most are ATP-

competitive, but with varying potencies and specificities, and interestingly, are very structurally diverse. The majority that have reached Phase I or II clinical trials (XL-884, AZD-7762, PF-00477736, LY2606368 and LY2606368) are all dual Chk1/Chk2 inhibitors. Only one Chk1 inhibitor, SCH900776, has reached this stage of clinical assessment, and all of the more recently developed Chk2 specific inhibitors are still in preclinical stages of investigation (Table 1).

CLINICAL TRIALS OF CHK1/CHK2 INHIBITORS

XL-884 (EXCEL-9844) is a potent ATP competitive, aminopyrazine carboxamide dual Chk1/Chk2 inhibitor that has been well characterized preclinically and was investigated in one of the first Phase I trials initiated in September 2005. Increased gemcitabine-induced Chk1 phosphorylation at Ser317, and in parallel, elevated levels of phosphorylated H2AX were found in XL-884 treated cells, suggesting that Chk1 inhibition leads to increased DNA damage and hence increased upstream signaling from ATR. No concomitant downstream degradation of Cdc25A or activation of the S-phase checkpoint was seen. Taken together, these markers indicate a greatly increased level of DNA damage resulting from the combination treatment relative to the treatment with the antimetabolite gemcitabine alone. This nucleoside analogue is incorporated into replicating DNA to produce strand breaks and also depletes the nucleotide intermediate pool through inhibition of ribonucleotide reductase, leading to an S-phase arrest that requires functional Chk1 signaling. In vitro studies have also shown that XL-884 is able to release the S-phase cell cycle arrest induced by gemcitabine, with the treated cells having a premature entry into mitosis and the induction of cell death through mitotic catastrophe. Furthermore, XL-884 treated cells are markedly more sensitive to the cytotoxic effects of gemcitabine, an effect seen across a panel of diverse solid tumour cell types. In vivo XL-884 in combination with gemcitabine was shown to result in tumour growth inhibition in a PANC-1 ectopic xenograft model, and in combination with daunorubicin, it caused a significant increase in median survival in a chronic myeloid leukemia model. Based on these observations, XL-884 entered into Phase I trials for leukemias and lymphomas as a single agent as well as in combination with gemcitabine, but drug development has reported to have been discontinued (see Table 1, (Ashwell et al. 2008; Garrett and Collins 2011)) and references therein)

AZD7762 is a potent and relatively selective thiophene carboxamide urea-based Chk1/Chk2 inhibitor that did not inhibit either cyclin-dependent kinases or protein kinase isoforms and abrogated the G2/M checkpoint induced by camptothecin in HT-29 adenocarcinoma cells. Subsequent studies showed that the compound enhances the antitumor activity and abrogates S- and/or G2-phase checkpoints mediated by a wide panel of both antimetabolites and DNA damaging agents, including IR in various p53-deficient models and isogenic cell lines depleted for p53. These data support the hypothesis that checkpoint inhibitors specifically enhance the cytotoxicity of DNA damaging agents in a p53-deficient

background (see Table 1 and references there in). Biomarker studies assessing the formation of phosphorylated Chk1 (Ser345) and H2AX have provided evidence of increased levels of DNA damage under such experimental conditions. Indeed, a molecular signature for pharmacological Chk1 inhibition has emerged from such studies, consisting of a dose dependent inhibition of gemcitabine induced Chk1 auto-phosphorylation on Ser296, inhibition of depletion of Cdc25A, decrease in pTyr15 CDK1, and increases in gamma H2AX and PARP cleavage, which are indicative of increased DNA damage and apoptosis, respectively (reviewed in Garrett & Collins 2011). In a number of xenograft models, AZD7762 overcomes topotecan-induced cell cycle arrest in a pharmacodynamic model in a dose-dependent manner and potentiates the effects of gemcitabine and irinotecan (Ashwell and Zabludoff 2008). Three phase one clinical trials are being conducted with AZD7762 (Table 1).

PF-473336 is a potent diazepinoindolone Chk1 inhibitor with a moderate selectivity over Chk2 (Table 1), but also inhibits several other tyrosine or serine/threonine kinases. Preclinical data for PF-473336 has been reported (see Table 1 and references therein). In vitro the compound abrogates the cell cycle arrests induced by several DNA damaging agents. Chemopotential and radiopotential was shown to be p53-dependent, with cytotoxicity enhanced in p53 defective tumour lines. PF-473336 also enhances the antitumour activities of docetaxel, an antimicrotubule agent that prevents depolymerisation of microtubules during mitosis and activates the mitotic checkpoint, in colon and breast cancer xenograft models, opening up the possibility for using Chk1 inhibition in combination with antimitotic agents. Preliminary data from the phase I trial of gemcitabine in combination with PF-473336 was reported at the 2010 ASCO meeting; however, it has been reported that Pfizer has discontinued its further development (see Table 1 and references therein).

SCH900776 is a potent ATP-competitive pyrazolo[1,5-a]pyrimidine inhibitor that shows the best reported selectivity for Chk1 (compared to Chk2) to date and is effective at abrogating both the S- and G2-checkpoints caused by IR and various DNA-alkylating agents (Table 1). However, it does inhibit CDK2 activity ($IC_{50} = 160\text{nM}$). This off-target activity might reduce its overall effectiveness depending on dosing and scheduling, as the inhibition of CDK2 could induce cell cycle arrest and prevent checkpoint bypass in response to Chk1 inhibition. A phase I dose escalation study of SCH900776 in combination with gemcitabine in solid tumours was reported at the 2010 ASCO meeting (see (Ma et al. 2011) for details) and provided pharmacodynamic evidence of Chk1 inhibition at the clinical dose and some partial responses, including stable disease. SCH900776 has also been used in Phase I trials for acute leukemia in combination with the anti-metabolite cytarabine.

The second generation inhibitors LY2603618 and LY2606368 have both been through Phase I trials (Table 1). LY2606368 is being used as a single agent treatment for advanced cancers, whereas

LY2603618 is being tested in Phase II trials for non-small-cell-lung-cancer in combination with pemetrexed and in Phase I and II trials for pancreatic cancer in combination with gemcitabine.

DEVELOPMENT OF CHK2 SPECIFIC INHIBITORS

The inhibitors described above are in the majority dual Chk1/Chk2 inhibitors, albeit with varying degrees of activity against the two kinases (Table 1). Thus, it is reasonable to assume that clinically effective doses are likely to inhibit both, raising the question of which preclinical and clinical responses result from Chk1 inhibition as opposed to Chk2 inhibition. This has been addressed to a certain extent by making use of specific knock-down of one or the other kinase using for instance using small interfering RNA approaches. The knockdown of CHK1 in the presence of endogenous Chk2 is sufficient to abrogate S- and G2-checkpoints in cells with DNA damage (Zhao et al. 2002; Carrassa et al. 2004). However, CHK2 knockdown in isogenic cell lines does not induce checkpoint bypass, nor does its knockdown synergise with CHK1 knockdown to potentiate checkpoint bypass after exposure to antimetabolite drugs (Cho et al. 2005; Morgan et al. 2006), suggesting that it is Chk1 inhibition that enhances the cytotoxicity seen. A small number of specific Chk2 inhibitors have been identified (Table 1 and references therein), and it will be important to evaluate the pharmacological properties of these inhibitors in cell culture. In addition, it will be of great interest to address the p53 dependence of the responses, a contentious issue that remains to be fully resolved (see for instance (Antoni et al. 2007)), and to investigate their anti-proliferative effects as single agents in cancer cells with endogenous Chk2 activation before moving onto more advanced preclinical and clinical studies.

COMBINATION THERAPIES AND CHECKPOINT INHIBITORS AS SINGLE AGENTS

As highlighted above, the majority of the preclinical and subsequent clinical trials are evaluating the clinical impact of a combination of a Chk1/Chk2 inhibitor with drugs that induce replication stress and lead to an S-phase arrest, such as the antimetabolite gemcitabine. Thus, from a mechanistic basis, it would be expected that Chk1/Chk2 inhibitors could be used to potentiate the cytotoxicity of other replication stress inducing agents, such as the antimetabolite 5-fluorouracil (5-FU) that is commonly used for the treatment of colon cancer and a range of DNA damaging agents that cause single-strand DNA breaks and lead to S-phase arrest. Topoisomerase I inhibitors, such as irinotecan and topotecan, which are commonly part of combination therapies for colon, ovarian and lung cancer, would fit into this latter category. Indeed, various Chk1 inhibitors have been shown to sensitise human tumour cell and xenograft models to topoisomerase I inhibitors (see (Garrett and Collins 2011) for recent review). Inhibition of topoisomerase II activity by drugs such as etoposide and doxorubicin also causes cell cycle arrest in late S and G2 phase, and there is some data suggesting that Chk1 inhibitors can potentiate the cytotoxicity of doxorubicin. Moreover, Chk1 inhibitors in combination with IR may be

a therapeutic strategy. Promising results in cancer cell lines and xenograft models have been obtained, but have not yet been verified in cancer patients. As discussed above, radiotherapy can be considered a local treatment, and thus, the use of Chk1 inhibitors as radiosensitizers may increase IR efficacy whilst minimizing normal tissue toxicity. Whereas combining Chk2 inhibitors with DNA damaging agents remains controversial (see (Antoni et al. 2007; Garrett and Collins 2011)), there is some evidence that Chk2 inhibition might have therapeutic potential in combination with PARP inhibition (McCabe et al. 2006). More recent studies have shown that CCT241533, a potent and selective inhibitor that binds to the ATP pocket of Chk2, potentiates the cytotoxicity of PARP inhibitors, but not of other DNA damaging agents in a panel of tumour cell lines, including p53-deficient lines. This finding supports earlier observations and opens new possible therapeutic avenues for such tumours (Anderson et al. 2011).

DNA repair deficient tumor cells have been shown to accumulate high levels of DNA damage. Consequently, these cells become hyper-dependent on DDR pathways, including the Chk1-kinase-mediated response, implying that DNA repair deficient tumors would exhibit increased sensitivity to Chk1 inhibitors as single agent treatments. For example, it has been shown using isogenic pairs of cell lines differing only in the FA DNA repair pathway, that FA-deficient cell lines were hypersensitive to Chk1 silencing by independent siRNAs, as well as Chk1 pharmacologic inhibition using UCN-01. In parallel, a siRNA screen designed to identify genes that are synthetically lethal with Chk1 inhibition identified factors required for FA pathway function (Chen et al. 2009). Chk1 has also emerged as the most potent hit from a siRNA screen of the protein kinome in neuroblastoma cell lines, suggesting that the kinase is potential therapeutic target specific for this disease (Cole et al. 2011).

OUTSTANDING ISSUES

There are a number of outstanding issues that will need to be resolved before the potential of Chk1 and Chk2 inhibitors can be fully realized. For instance, the optimization of their use alone or in combination will be complex, as there are many possible combinations and dose-scheduling strategies. In addition, there are questions that remain regarding the potential side-effects of kinase inhibition in normal tissues, as well as the possibility that toxicity could be exaggerated from the combination of these agents with existing chemotherapeutic agents. Chk1 inhibition is also known to cause genetic instability, and thus, the long-term risk that therapy related secondary cancer formation could be increased needs to be evaluated. Based on recent reviews of the Chk1/Chk2 patent literature (Janetka and Ashwell 2009; Lainchbury and Collins 2011), many new compounds will be entering the clinical arena. The challenge will therefore be to develop robust biomarkers to assess the efficacy of these new potential therapeutic tools and to optimize patient selection if these agents are to achieve maximum utility. In this respect, one question that still remains to be fully clarified is whether the p53 status

correlates with tumour response in studies that combine DNA damage with Chk1 and/or Chk2 inhibition. Some of the conflicting reports may be related to the dosing schedules and the integrity of the p53 pathway, and clearly, this will need to be carefully assessed to resolve this issue.

CONCLUSIONS

The concept and development of DNA repair and checkpoint inhibitors is a field of intense interest and as noted above from the recent patent literature seems likely to continue to evolve. In vitro and in vivo preclinical data have shown that the inhibition of the DNA damage PIKKs ATM and ATR, or their down-stream targets, the Chks, can potentiate the effects of DNA damage. However, it has to be noted that the inhibitors so far developed have not yet completed validation in clinical trials, and importantly, none have to date been assessed in combination with radiation. As discussed in this Chapter, there are a number of outstanding issues that remain to be resolved including toxicity and patient choice. The first generation Chk1 inhibitor UCN01 showed significant limiting toxicity in phase I trials, and toxicity has been associated with the second generation inhibitors, yet would appear to be drug-specific and might reflect off-target effects. It is hoped that toxicity might be reduced by the use of more specific inhibitors in combination with pharmacodynamic biomarkers to follow kinase inhibition. The findings that many tumours have lost the expression of one or more of these four kinases and that a vast majority of tumours are thought to have a defect in G1 control (Massague 2004) would suggest that ATM/ATR and the cell cycle kinase inhibitors could be applied to a wide background. Determining the molecular profile of individual tissues would allow the variation in responses to be better understood and contribute to determining the criteria necessary for the selection of appropriate patient populations that would most benefit from such targeted therapies. Clearly, over the next decade with access to technologies that will facilitate personalized medicine (see Chapter Bell), many of these issues will be resolved, and the new generation potent inhibitors will then find their place in the clinic.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Institut Curie and a grant from INCA (07/3D1616/DAAD-83-05); Sara Chiker is a recipient of a PhD student fellowship from the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

Table 1. Properties of Chk1 and Chk2 inhibitors in preclinical and clinical trials.

Compound	Inhibitory activity	Preclinical data	Clinical trial Phase	Combination	Tumour type	Status	Publications
UCN-01	Chk1 IC ₅₀ 11nM Chk2 IC ₅₀ 104.0nM	(Courage et al. 1995) (Mack et al. 2003) (Dai et al. 2002) (Ma et al. 2012) (Tang et al. 2012) (Ma et al. 2011)	I/II I I II	Single agent Cisplatin Irinotecan Topotecan	AST AST AST Ovarian cancer	Trials terminated	(Frascaso et al. 2011) (Ashwell and Zahradoff 2008)
AZD7762 5(Astra Zeneca)	Chk1 IC ₅₀ 5nM Chk2 IC ₅₀ <10nM	(Tang et al. 2012) (Ma et al. 2011) (Zahradoff et al. 2008) (McNeely et al. 2010) (Mitchell et al. 2010) (Morgan et al. 2010) (Seol et al. 2011) (Didier et al. 2012) (Aris and Pommer 2012) (Bartucci et al. 2011) (Yang et al. 2011b) (Ashwell et al. 2008)	I I I	Gem Irinotecan Gem	AST AST AST	Trials terminated	Closed awaiting publication
XL984 (Exelixis)	Chk1 IC ₅₀ 2.2 nM Chk2 IC ₅₀ 0.07 nM	(Ashwell et al. 2008) (Mathews et al. 2007)	I	Single agent Gem	Lymphoma AST	Trials terminated further development discontinued	-
PF-00477736 (Pfizer)	Chk1 IC ₅₀ 0.5nM Chk2 IC ₅₀ 87 nM	(Ashwell et al. 2008) (Blasina et al. 2006) (Zhang et al. 2009)	I	Gem	AST	Trial terminated further development discontinued	-
SCH90076 (Schering Plough)	Chk1 IC ₅₀ 3nM Chk2 IC ₅₀ 1500nM	(Guzi et al. 2011)	I I	Gem Cytarabine	AST Leukemia	Trial terminated Closed	Closed awaiting publication

Table 1. cont'd....

Based on published information and the Clinical Trials site (<http://clinicaltrials.gov>)

AST: Advanced solid tumours; Gem: Gemcitabine; NSCLC Non-Small Cell Lung Cancer

FIGURE LEGENDS

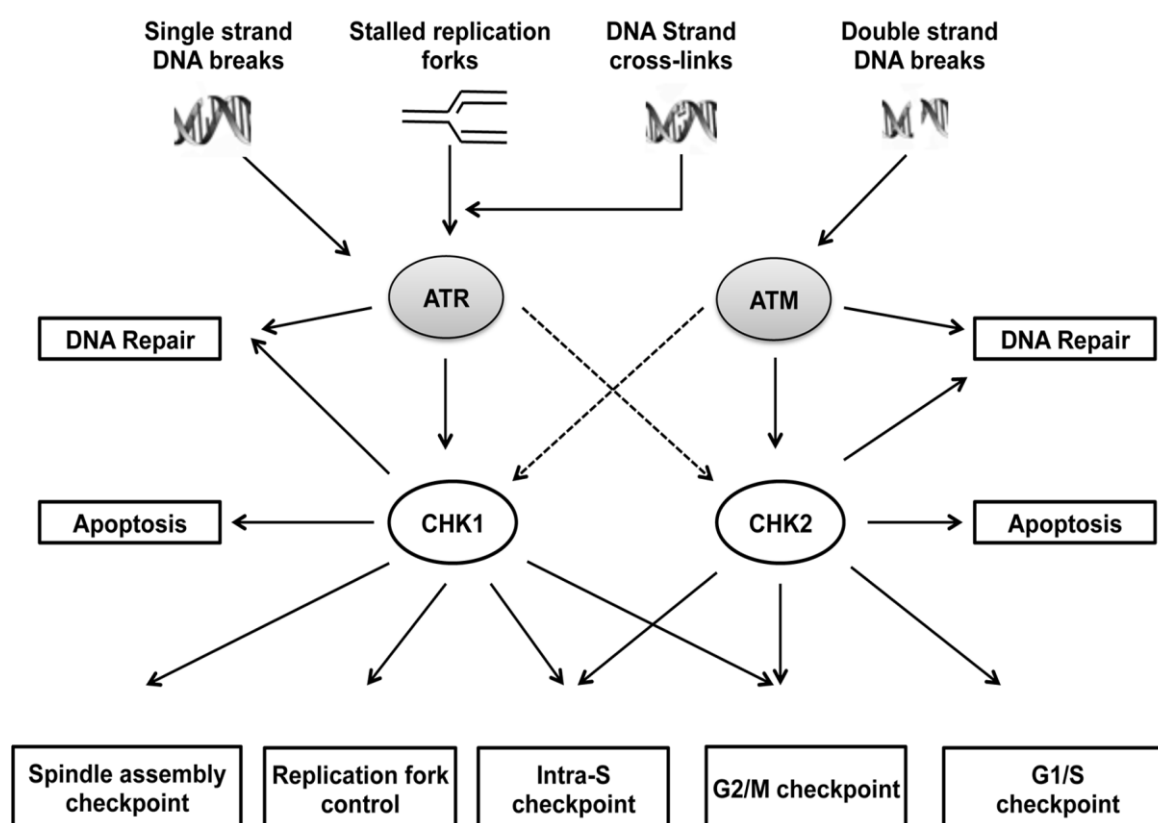


Fig. 1 The roles of ATM and ATR and the checkpoint kinases Chk1 and Chk2 in the DNA damage response. Endogenous or exogenous DNA damage (single- and double-strand breaks, stalled replication forks, chemical adducts etc.) is detected by and activates the ATR and ATM kinases that in turn activate the checkpoint kinases Chk1 and Chk2. The subsequent signaling cascades can halt the cell cycle to prevent entry into S-phase (G1/S checkpoint), delay progression through S-phase (intra-S or S-phase checkpoint) or stop the cell from entering mitosis (G2/M checkpoint). Chk1 also plays a role in the control of the spindle assembly checkpoint that can delay chromosome separation in mitosis. The activated kinases can also initiate DNA repair processes specific to the nature of the DNA damage and the phase of the cell cycle in which the DNA damage occurred and the cell is arrested. If repair of the damage fails, prolonged activation of the checkpoint can trigger apoptosis through both p53-dependent and independent processes.

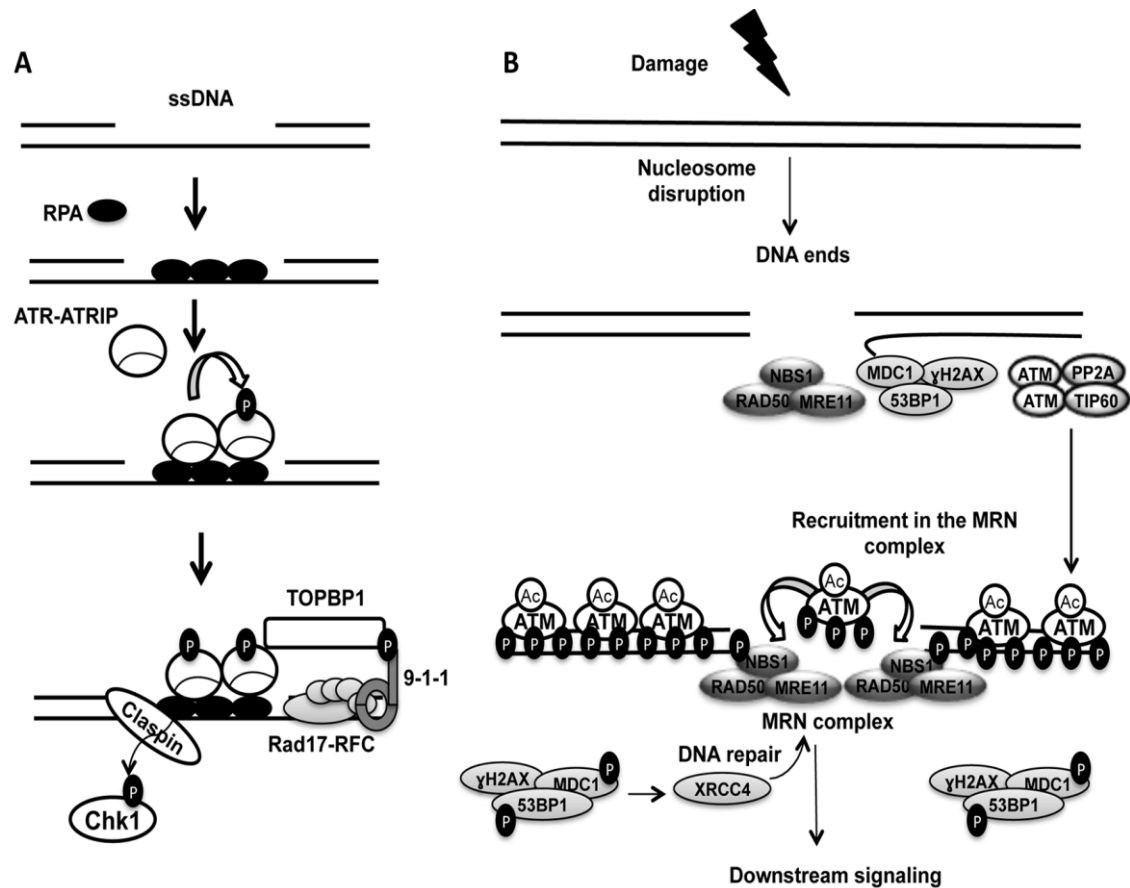


Fig. 2 Molecular organization of ATR and ATM activation. (A) Model for ATR-ATRIP activation by DNA damage. Single-stranded DNA (ssDNA) and the junctions of ssDNA and dsDNA (double-stranded DNA) are the basic structural elements that trigger the ATR-ATRIP activation. (i) ssDNA is recognized and coated by RPA and (ii) RPA coated ssDNA recruits the ATR-ATRIP kinase by interacting with ATRIP, possibly contributing to its activation by promoting ATR auto-phosphorylation at Thr1989. The presence of RPA leads to the recruitment of the Rad17-RFC complex that loads the 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1) checkpoint clamp to the 5' recessed junction. TopBP1 is then recruited through interactions with phosphorylated ATRIP-ATR and phosphorylated RAD9 within the 9-1-1 complex. TopBP1's ATR-activating domain then stimulates the kinase activity of ATR. The subsequent phosphorylation of the Chk1 kinase requires the mediator Claspin that recruits Chk1 to the damage site (Xu and Leffak 2010; Liu et al. 2011). (B) Model for ATM activation. ATM is partly activated and undergoes monomerisation in the vicinity of the break, where it can phosphorylate certain substrates like p53. ATM is then recruited to the site of the break by the Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex and phosphorylates members of this complex and other downstream effectors. The activation process involves auto-phosphorylation of serines 367, 1893, 1981. The protein phosphatase PP2A is constitutively associated with ATM,

presumably to ensure that it is not inappropriately activated by auto-phosphorylation. In the presence of DNA damage, PP2A dissociates from the inactive ATM dimers and loses its activity, thereby minimizing the risk of competition between phosphorylation and phosphatase activities. The acetyltransferase TIP60 is also constitutively associated with ATM, and in the presence of DNA DSBs, it becomes activated and acetylates (Ac) ATM at Lys3016. One of the earliest phosphorylation events is that of the histone H2AX and the mediator of DNA-damage checkpoint protein-1 (MDC1), which binds to γ H2AX and acts as a scaffold or platform to ensure the retention of the DNA-damage recognition/repair complex on chromatin. The MRN complex binds to MDC1 through NBS1 for retention on chromatin. XRCC4, the requisite cofactor of DNA ligase 4 and non-homologous end joining (NHEJ), is detected at the break site after ATM recruitment.

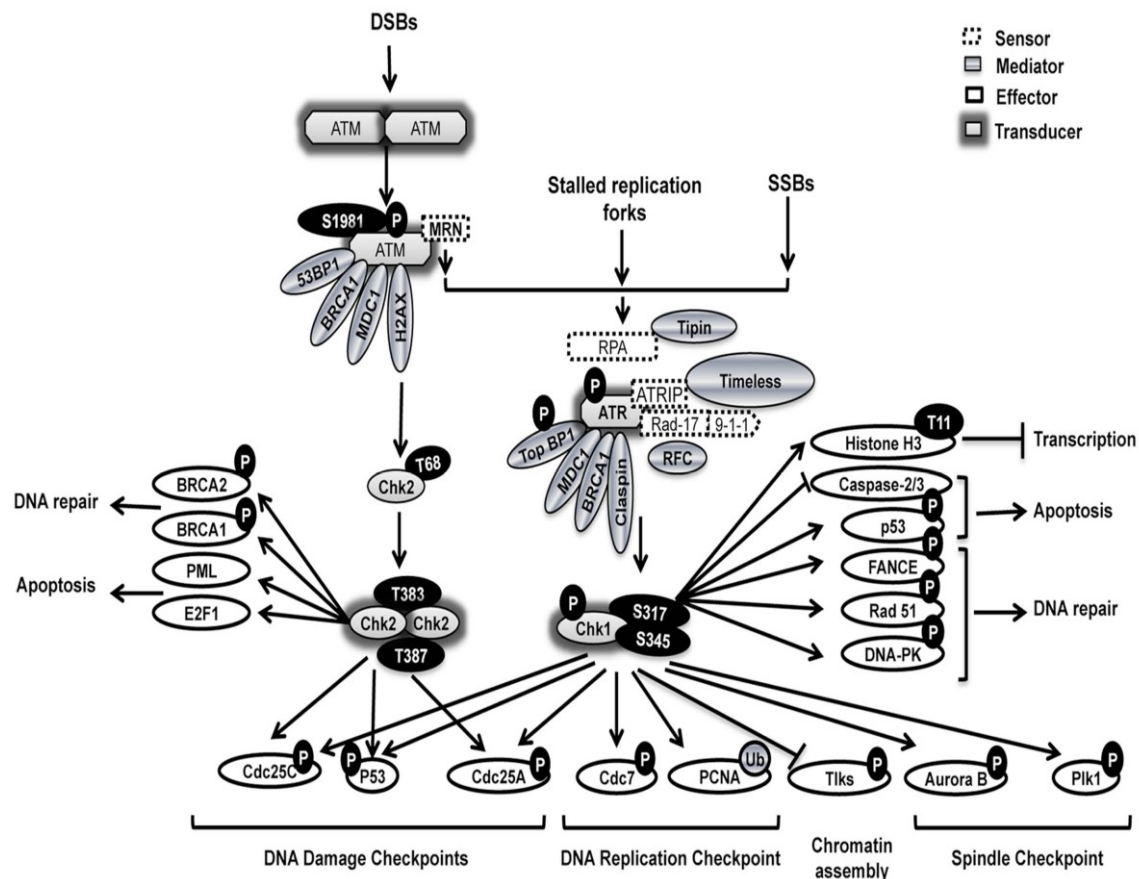


Fig. 3 Chk1 and Chk2 in the DDR signaling network. DNA damage (e.g., DSBs, SSBs, and stalled replication forks) initiates ATR-mediated Chk1 and ATM-mediated Chk2 activation. In conjunction with recruited/activated sensors and mediators, ATR phosphorylates Chk1 at two canonical sites (Ser345 and Ser317), directly leading to its activation. In contrast, the activation of Chk2 involves its homodimerization and intramolecular trans-auto-phosphorylation (on Thr383 and Thr387) that is initiated by the phosphorylation of Thr68 by ATM. Activated Chk1 and Chk2 then phosphorylate a number of overlapping and distinct downstream effectors, which in turn are involved in cell cycle checkpoints (i.e., intra-S-phase, G2/M-phase, and G1/S-phase checkpoints), the DNA replication checkpoint, and the mitotic spindle checkpoint, as well as DNA repair, apoptosis, and transcription. Consequently, Chk1 and Chk2 are central kinases for the DDR signaling network, thereby representing particularly attractive targets in anticancer therapeutics.

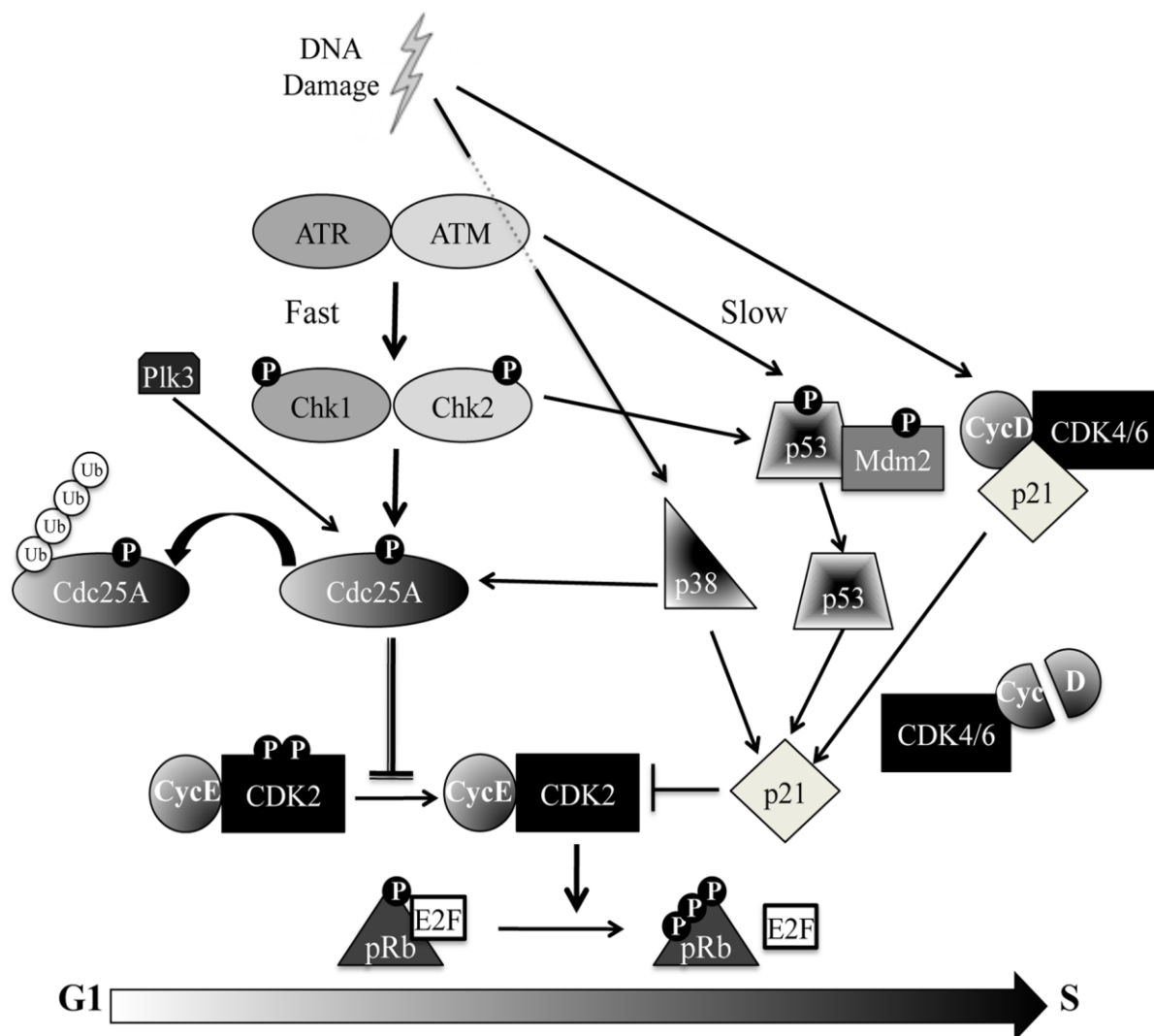


Fig. 4 Cyclin-CDKs complexes and their inhibitors involved in cell cycle progression control. The cell cycle of eukaryotic cells can be divided into four successive phases: M phase (mitosis), in which the nucleus and the cytoplasm divide; S phase (DNA synthesis), in which the DNA in the nucleus is replicated, and two gap phases, G1 and G2. The transition from one phase of the cell cycle to the next is controlled by cyclin-CDK (cyclin-dependent kinase) complexes, which ensure that all phases of the cell cycle are executed in the correct order. Progression through the mitotic cycle is driven by the actions of CDKs and their activating cyclin subunits. CDK activity is suppressed through interactions with two main families of inhibitory proteins (CDK inhibitors or CDKIs): the INK4 family that exhibits selectivity for CDK4 and CDK6, and the CIP/KIP family that has a broader range of CDK inhibitory activity (Adapted from (Dehay and Kennedy 2007)).

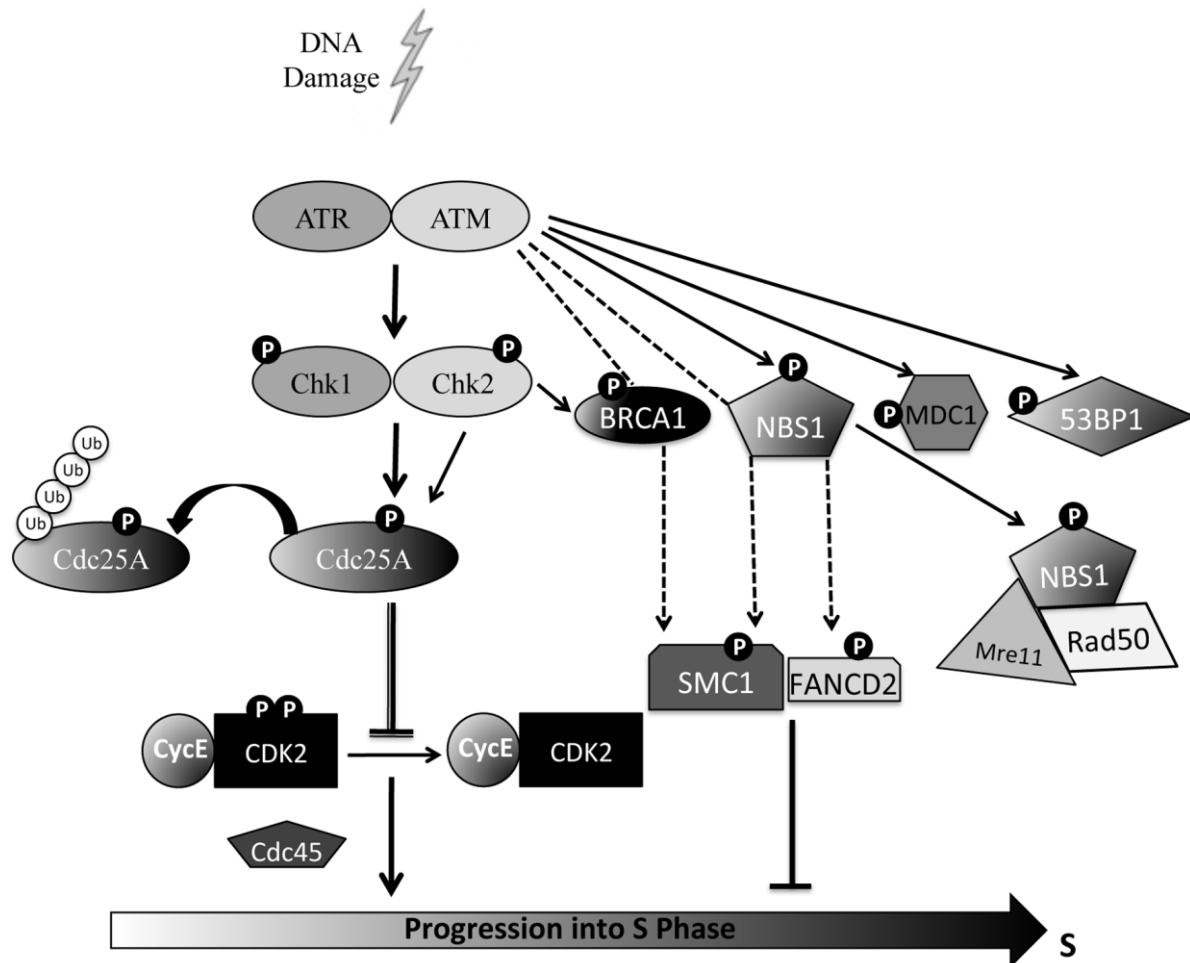


Fig. 5 Molecular organisation of the G1/S checkpoint. Cells exposed to DNA damaging agents respond by activating ATM and ATR, which rapidly phosphorylate and activate the checkpoint kinases Chk2 and Chk1, respectively. In turn, these activated kinases phosphorylate Cdc25A, accelerating its degradation through the ubiquitin (Ub)-proteasome pathway. The absence of the Cdc25A phosphatase activity “locks” the CDK2 kinase in an inactive phosphorylated form, leading to G1 arrest. Another slower pathway involves the stabilization of p53 via its phosphorylation by ATM/ATR and Chk1/Chk2 that stabilizes the protein by preventing its interaction with Mdm2. Accumulation of a stable and transcriptionally active p53 protein results in the induction of a number of genes, including P21, which encodes a protein that binds and inhibits the Cyclin E-CDK2 complex. This pathway is important for the maintenance of the checkpoint. DNA damage also induces degradation of Cyclin D1, disruption of the Cyclin D1-CDK4/6 complex, and release of p21 that is associated with this complex, allowing p21 to then inhibit CDK2. Although less well established, p38 Map Kinase can also contribute to the induction of a G1/S checkpoint through the activation of p21 and phosphorylation of Cdc25A, which promotes its

degradation. Inhibiting both CDK2 and CDK4/6 kinase complexes leads to the dephosphorylation of Rb, inhibition of the release of the E2F transcription factor and, as a consequence, inhibition of the E2F-dependent transcription of S-phase genes (see text for details).

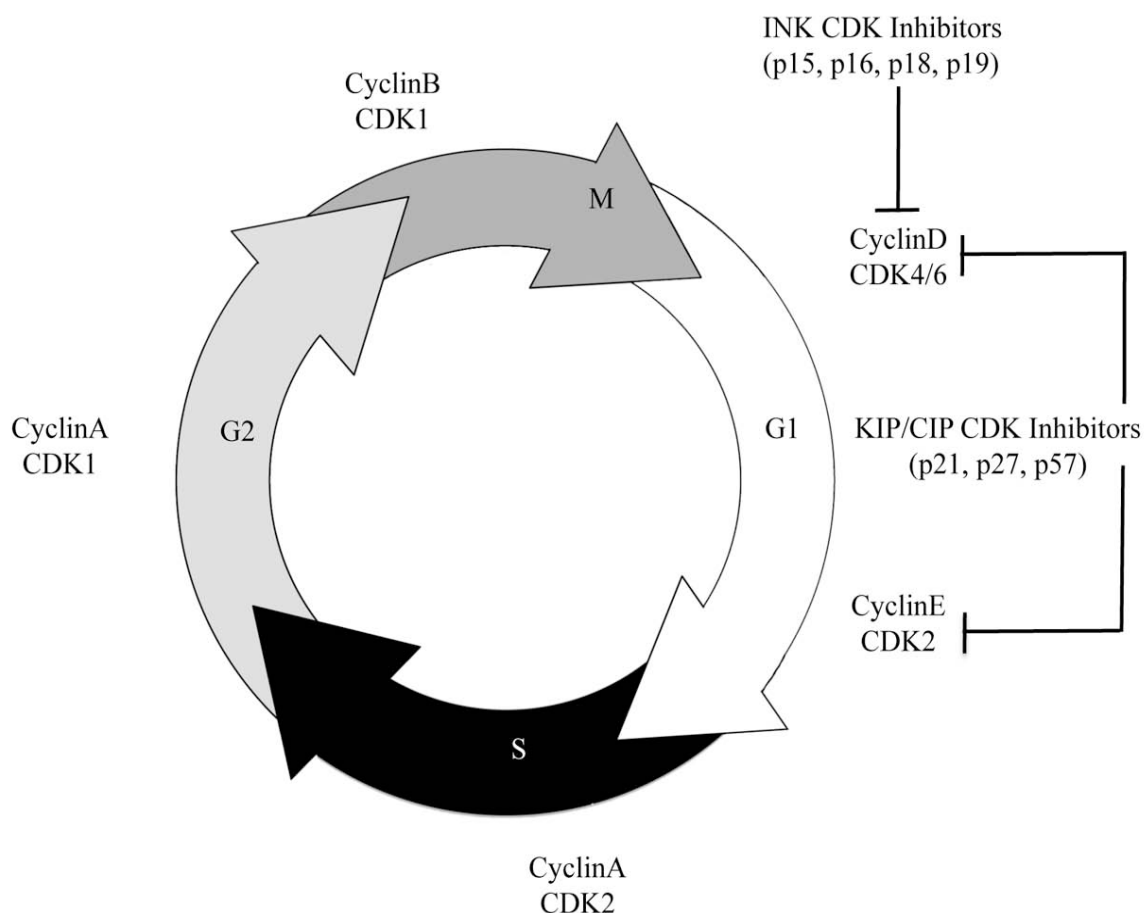


Fig. 6 Molecular organisation of the intra-S checkpoint. In response to DNA damage, ATM/ATR triggers two parallel cascades that cooperate to inhibit replicative DNA synthesis. The first operates through the activation of Chk1/Chk2, Cdc25A phosphorylation and inhibition of the Cyclin E/CDK2 complex activity (see Fig. 5 and text for details), preventing the loading of Cdc45, an essential replication factor, on replication origins, and thus, causing delay in S phase progression. A second pathway is initiated by the phosphorylation of NBS1 and involves the NBS1-dependent phosphorylation of SMC1 and FANCD2. Other targets of ATM/ATR and Chk1/Chk2, such as BRCA1, MDC1 and 53BP1, also contribute to the S-phase checkpoint, but the mechanisms remains unclear (see text for details).

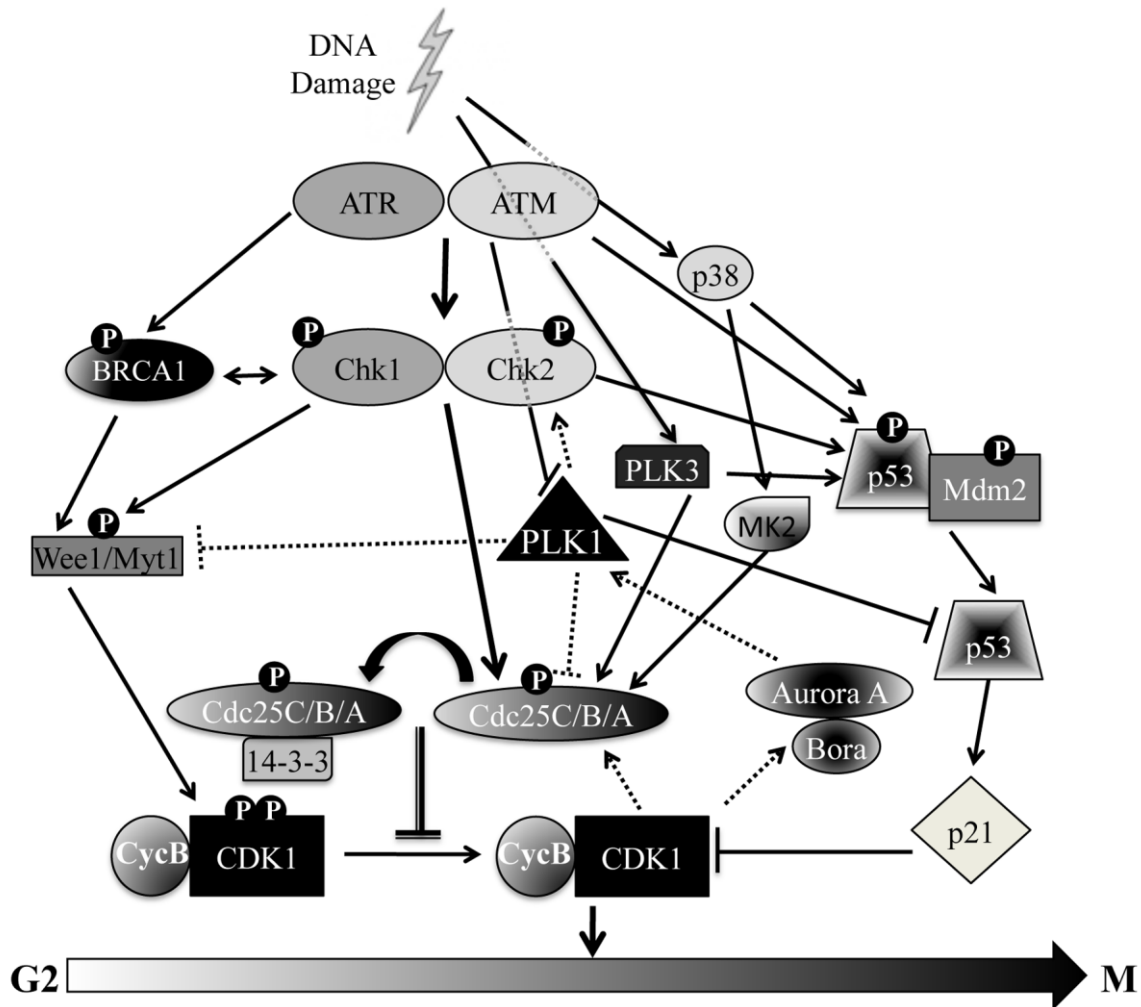


Fig. 7 Molecular organisation of the G2/M checkpoint. In response to DNA damage, the G2/M checkpoints are exerted through p53-dependent and p53-independent pathways, both of which target the activation of Cyclin B-CDK1. Both responses are triggered by the activation of ATM/ATR and the Chk1 and Chk2 kinases. In the p53-independent pathway, Chk1 and Chk2 phosphorylate CDC25s, leading to their sequestration in the cytoplasm by 14-3-3 proteins, which prevents the activation of cyclin B-CDK1 by Cdc25 and results in a G2 arrest. Further inhibition of this complex takes place through a slowly activated p53-dependent pathway. P53 is stabilized in G2 by multiple post-translational modifications, and it contributes to the inhibition of Cyclin E-CDK1 by increasing the transcription of p21 and repressing the expression of Cyclin B. The Cdc25-CDK1 pathway is also regulated by polo-like kinases PLK1 and PLK3 and the MK2 kinase. The activity of CDK1 is also directly regulated by the Wee1 and Myt1 kinases, which are regulated by PLK1 and Chk1 phosphorylation and by BRCA1. Active CDK1 is able to stimulate its own further activation by an inner feedback loop involving Cdc25s, PLK1, Wee1 and Myt1 (dotted lines). Moreover,

the p38-MK2 pathway also contributes to the arrest in G2 by phosphorylation of Cdc25 and activation of p53 (see text for details).

PARP-2 depletion results in lower radiation cell survival but cell line-specific differences in poly(ADP-ribose) levels

Mohammed-Tayyib Boudra · Celeste Bolin · Sara Chiker · Alexis Fouquin · Tomasz Zaremba · Laurence Vaslin · Denis Biard · Fabrice P. Cordelières · Frédérique Mégnin-Chanet · Vincent Favaudon · Marie Fernet · Vincent Pennaneach · Janet Hall

Received: 19 February 2014 / Revised: 15 October 2014 / Accepted: 17 October 2014
© Springer Basel 2014

Abstract Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) activity contributes to a cells' poly(ADP-ribosyl)ating potential and like PARP-1, has been implicated in several DNA repair pathways including base excision repair and DNA single strand break repair. Here the consequences of its stable depletion in HeLa, U20S, and AS3WT2 cells were examined. All three PARP-2 depleted models showed increased sensitivity to the cell killing effects on ionizing radiation as reported in PARP-2 depleted mouse embryonic fibroblasts providing further evidence for a role in DNA strand break repair. The PARP-2 depleted HeLa cells also showed both higher constitutive and DNA damage-induced levels of polymers of ADP-ribose (PAR) associated with unchanged PARP-1 protein levels, but higher PARP

activity and a concomitant lower PARG protein levels and activity. These changes were accompanied by a reduced maximal recruitment of PARP-1, XRCC1, PCNA, and PARG to DNA damage sites. This PAR-associated phenotype could be reversed in HeLa cells on re-expression of PARP-2 and was not seen in U20S and AS3WT2 cells. These results highlight the complexity of the relationship between different members of the PARP family on PAR metabolism and suggest that cell model dependent phenotypes associated with the absence of PARP-2 exist within a common background of radiation sensitivity.

Keywords Base excision repair · Double strand break repair · Single strand break repair · Poly(ADP-ribose) polymerases · PARG · Ionizing Radiation · Neocarzinostatin

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-014-1765-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M.-T. Boudra · C. Bolin · S. Chiker · A. Fouquin · T. Zaremba · L. Vaslin · F. P. Cordelières · F. Mégnin-Chanet · V. Favaudon · M. Fernet · V. Pennaneach · J. Hall
Institut Curie, Centre de Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

M.-T. Boudra · C. Bolin · S. Chiker · A. Fouquin · T. Zaremba · L. Vaslin · F. Mégnin-Chanet · V. Favaudon · M. Fernet · V. Pennaneach · J. Hall
Inserm, U612, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

M.-T. Boudra · S. Chiker · A. Fouquin
Faculté de Médecine, Université Paris-XI, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France

D. Biard
Commissariat à l'Energie Atomique, DSV-iMETI-SEPIA, 92265 Fontenay Aux Roses, France


F. P. Cordelières
CNRS, UMR3348, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

F. P. Cordelières
Plateforme IBiSA d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Institut Curie, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

J. Hall (✉)
Inserm U612, Institut Curie-Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France
e-mail: janet.hall@curie.fr

Present Address:
C. Bolin
Department of Biology, The College of Idaho, 2112 Cleveland Boulevard, Caldwell, ID 83605, USA

Published online: 22 October 2014

 Springer

Introduction

The observation that polymers of ADP-ribose (PAR) could be synthesised in response to DNA-damaging agents in cells from *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (Parp1)* knockout (KO) mice [1, 2] led to the isolation of a second poly(ADP)ribose polymerase, PARP-2 [1]. In mouse models, the KO of either *Parp1* or *Parp2* has no impact on viability; however, embryonic lethality is seen in the double KO mice suggesting that there is some overlap in the cellular activities of these two members of the PARP family as DNA damage sensors and signal transducers in single strand break repair (SSBR), base excision repair (BER), and double strand break repair (DSB) [3, 4] (for reviews see [5, 6]). Both PARP-1 and PARP-2 are activated through their binding to DNA strand interruptions, and catalyze the transfer of ADP-ribose moieties from NAD⁺ to acceptor proteins, resulting in the attachment of linear or branched PAR. PARP-1 and PARP-2 can form homodimers and heterodimers [4] and are themselves targets for poly(ADP-ribosyl)ation with this auto-modification playing a key role in the control of their activity and localization. Both proteins are recruited to sites of laser-induced DNA damage, albeit with different kinetics: PARP-1 was shown to accumulate quickly and transiently, while, in comparison to PARP-1, PARP-2 showed a delayed and persistent accumulation at repair sites in both MEFs and HeLa cells [7]. Based on these kinetic studies and the affinities of PARP-2 compared to PARP-1 for different DNA structures, it was proposed that PARP-2 had a role in the later steps of the BER process [7]. In addition to members of the PARP family, other proteins have a high affinity for poly(ADP-ribosyl)ated proteins or the polymers themselves which is exploited in certain mechanisms, such as DNA repair, for the control of the localization of proteins involved in these processes (see [8–10] and references therein). One such protein is XRCC1 that interacts physically and functionally with practically

all the actors of the BER and SSBR pathways [4, 11, 12] and in particular with those implicated in the Short Patch (SP) BER sub-pathway. Intriguingly, although XRCC1 is recruited very slowly to sites of laser-induced DNA damage in MEFs lacking *Parp1* in contrast to its normal recruitment in *Parp2* deleted MEFs [7], XRCC1 negatively regulates the activity of both PARP-1 and PARP-2 by limiting their auto-modification and thus forcing them to reside on the DNA damage site [4]. Taken together these results would suggest that each PARP contributes differently to the SSBR and BER mechanisms. Extensive studies on PARP-1 have allowed its role in these two repair mechanisms to be defined (for a review see [13, 14]) in addition to its involvement in other repair mechanisms such as the alternative non-homologous end-joining (NHEJ) [15–17] and nucleotide excision repair [18, 19]. In contrast, although biochemical studies have revealed that PARP-2, like PARP-1, interacts with the SSBR/BER factors XRCC1, DNA polymerase beta and DNA ligase III [1, 4], its role in both SP and Long Patch (LP) BER sub-pathways remains to be fully elucidated and in particular in human cells.

In the present study, the impact of the stable depletion of PARP-2 in three cell models was examined. In all an increased sensitivity to the cell killing effects of ionizing radiation was detected supporting a role of PARP-2 in DNA strand break repair. However, only in the PARP-2 depleted HeLa cells was a phenotype observed of higher PARP activity and lower PARG protein levels associated with higher basal and DNA induced levels of PAR and sub-maximal recruitment of PARP-1 and BER proteins to sites of laser-induced DNA damage. These results highlight the complexity of the relationship between PARP-1, PARP-2, and PARG on the status quo of polymer levels and suggest that certain phenotypes associated with the depletion of PARP-2 are cell line dependent.

Materials and methods

Cell lines, gene silencing, and drugs

shRNA design and cloning in pEBVsiRNA vectors carrying a hygromycin B resistance cassette and establishment of stable knockdown clones for PARP-1 (PARP-1^{KD}), PARP-2 (PARP-2^{KD}), and PARG (PARG^{KD}) and Control clones by selection and amplification of resistant colonies to hygromycin B was carried out as previously described [1, 20, 21]. HeLa cells carrying the pBD650 plasmid that expressed an inefficient shRNA sequence were used as Controls [21]. The RNAi targeted sequences for *parp1* (NM_001618), and *parg* (NM_003631) were nucleotides 2,068–2,086 and nucleotides 2,325–2,343, respectively.

Present Address:

T. Zaremba
AstraZeneca Pharma Poland Sp. z o.o.ul., Postępu 18, 02-676
Warsaw, Poland

Present Address:

F. P. Cordelières
Pôle d'imagerie photonique, Institut François Magendie,
Bordeaux Imaging Center, UMS 3420 CNRS-Université de
Bordeaux-US4 INSERM, 146 Rue Léo-Saignat, 33077
Bordeaux, France

Present Address:

F. Mégnin-Chanet
Inserm U1030, Gustave Roussy Cancer Campus Grand Paris,
114 rue Edouard-Vaillant, 94805 Villejuif, France

For *parp2* (NM_005484) two sequences were targeted nucleotides 829–847 (clones 1,470/1 and 1470/7) and 1,077–1,095 (clone 1,471/13). All HeLa cells clones were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % FCS, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin in the presence of 125 µg/ml hygromycin B at 37 °C under 5 % CO₂. The control and PARP-2 depleted cell populations derived from the osteosarcoma cells U2OS and the SV40 immortalized fibroblast AS3WT2 cells from a healthy donor [22], were obtained by transfecting the pEBV vectors [21] expressing the control shRNA sequence (U2OS CTL and AS3WT2 CTL cells) or an shRNA that targeted *parp2* at nucleotides 829–847 (U2OS PARP-2^{KD} and AS3WT2 PARP-2^{KD} cells) unless otherwise indicated. Transfected cells were selected by supplementing the standard growth media with 150 µg/ml hygromycin B. All tissue culture reagents were from Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). The neocarzinostatin (NCS) holoprotein, prepared and titrated as described [23], was stored as a sterile 1 mM stock solution in 2 mM sodium formate buffer, pH 4.0, in liquid nitrogen.

Western blotting

Total protein extraction was obtained from the different cell lines using the M-PER (Pierce, Perbio Science, Brebières, France) reagent supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Protein concentrations were measured by the Bradford method using the Bio-Rad protein assay. Following denaturing extracts (40 µg/lane, 95 °C, 5 min) in Laemmli loading buffer and separation on 7.5 % SDS-PAGE gels, proteins were electro-transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5 % non-fat milk for 1 h at room temperature, incubated with the primary antibodies (ALX-210-303-Yuc anti-PARP-2 from ALEXIS Biochemicals, Villeurbanne, France, B01P anti-PARG from Abnova, Heidelberg, Germany, and C2-10 anti-PARP-1 from Trevigen, Gaithersburg, USA) overnight at 4 °C and then with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories, Soham, Cambridgeshire, UK) for 1 h at room temperature. Membranes were probed with an enhanced chemiluminescence reagent and re-hybridized with an anti- α -tubulin antibody clone DM1A (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). For PAR level analysis by western blot 1.5×10^6 cells were harvested in cold PBS and re-suspended in 50 µl of lysis buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 M urea, 10 % glycerol, 2 % SDS, 5 % 2-mercaptoethanol). The DNA was shredded by sonication and the samples were denatured by heating (65 °C, 15 min) prior loading onto a 7.5 % SDS-PAGE gel. After migration proteins were transferred onto Hybond Nylon membrane (GE Healthcare Lifescience,

Orsay, France). The membrane was blocked in PBS containing 0.05 % Tween-20 and 5 % non-fat milk for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4 °C with the anti-PAR polyclonal antibody (BD 551813) BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) and then with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Soham, Cambridgeshire, UK) for 1 h at room temperature. Membranes were probed with an enhanced chemiluminescence reagent ECL-prime (GE Healthcare Lifescience, Orsay, France) and the signal was detected using the G: Box Chemi XL1.4 (Syngene, Frederick, USA).

RNA extraction, reverse transcription, and real-time quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted using Rneasy mini kit (Qiagen). 1 µg RNA was reverse transcribed using the High Capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems). To quantify the relative expression level of *gapdh*, *parp1*, *parp2*, and *parg* Taqman gene expression assays were used (Applied Biosystems). Briefly, cDNA was diluted in Taqman gene expression master mix with the specific Taqman assay for *gapdh* (Hs99999905_m1), *parp1* (Hs00242302_m1), *parp2* (Hs00193931_m1) or *parg* (Hs00608256_m1), and real-time qPCR was carried out using a StepOnePlus (Applied Biosystems). The cycle conditions were 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. The threshold crossing value was obtained for each transcript and normalized to *gapdh*. The relative quantitation of each mRNA was performed using the comparative Ct method. Expression profiles were measured in three independent RNA samples.

Colony formation survival assays

To assess the clonogenic survival Control (1×10^3) and PARP-2^{KD} (2×10^3) cells were plated in 25 cm² flasks in triplicate, and allowed to adhere for 4–5 h at 37 °C before treatment. Flasks were then either exposed to ionizing radiation or treated with increasing concentrations of NCS. Aliquots of NCS were thawed just before use and diluted to the required treatment concentration in fresh complete medium adjusted to pH 7.0. The whole treatment was performed in dim light to avoid photo-induced degradation of the drug. Irradiations were carried out at room temperature using an IBL-637 (¹³⁷Cs) γ -ray irradiator (CIS-Biointernational, Gif-sur-Yvette, France) at a dose rate of 0.7 Gy/min or with a low-energy Philips MCN-323 X-ray generator (200-kVp, 0.3-mm copper and 1-mm aluminium additional filtration, 80-keV effective energy) operating at 21 mA with a dose rate of 1 Gy/min. To assess whether survival differed between the Control and PARP-2^{KD} cells

when irradiated in S-phase, cells were synchronized at the G1-S junction using a double thymidine block and γ -irradiated 2 h after release from the block. Cell cycle progression was monitored by dual parameter flow cytometry using a FACSCalibur cytofluorometer (Becton-Dickinson Biosciences) with BrdUrd pulse labeling (10 μ M, 15 min) of S-phase cells as described previously [24]. Colonies were allowed to grow for 10–15 days, before fixing with methanol, staining with Coomassie, and counting. Small colonies (less than 50 cells) were disregarded. The colony count relative to mock-treated cells (*S*) was adjusted for best fit to the classical linear-quadratic equation ($\ln S = -\alpha D - \beta D^2$) where *D* is the radiation dose and α and β adjustable parameters characterizing the response. Calculations were made through non-linear least-squares regression taking all data points into account, using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, Pennsylvania).

Expression plasmids and transfection

pEGFP-PARP-1 and pEGFP-PARP-2, pEGFP-NLS-PCNA, pXRCC1-YFP, pEGFP-PARG plasmids were a kind gift from Drs. V. Schreiber (UMR7175CNRS, ESBS, Illkirch, France), P. Kannouche (UMR 8200 CNRS, Gustave Roussy, Paris XI University, Villejuif, France), and P. Radicella (IRCM, CEA-DSV, Fontenay-aux-Roses, France), respectively. Plasmids were purified using a Macherey-Nagel NucleoBond[®] PC 500 EF kit (Düren, Germany). For live-cell experiments cells were plated at 50 % confluence onto 25 mm round glass coverslips and then transfected 24 h later using JETPEI (Polyplus transfection, Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France) according to the manufacturer's recommendations and cultured for a further 36 h before use.

Live-cell videomicroscopy

The recruitment and the real-time follow-up of the protein of interest was carried out through a Confocal Leica SP5 system attached to a DMI6000 stand using 63 \times /1.4 objective as previously described [25]. During experiments glass coverslips containing transfected cells were mounted in a Ludin Chamber and maintained at 37 °C. All recordings were made using the appropriate sampling frequency (512 \times 512 images, line average of 4 and zooming set to 7.94). DNA damage was generated using a 405 nm laser line (diode) focused onto a single spot of constant size (176 nm) within the nucleus to generate a point of damage with a constant amount of energy. Fluorophores were excited using a 488 nm (EGFP) or 514 nm (YFP) Argon laser line. Recruitment of the protein of interest was then monitored by fluorescence using the same setting as for the

pre-damage sequence. Nomarski contrast images were taken in parallel. Images were captured at 2–5 s interval. Cell motion during the acquisition was compensated with the StackReg plugin (Philippe Thévenaz, Biomedical Imaging Group, Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne) and the kinetics of the recruitment of proteins were analyzed under the ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2011) using an in-house developed macro. Data extraction is a semi-automated process where the user is first invited to draw two regions of interest (ROI): a nuclear region and the site of damage. The background ROI is automatically set to the inverse of the nuclear ROI. Intensity from the damage site is corrected for both the observational photo-bleaching and background, and normalized so that its intensity at start-up equals 1: corrected intensity = [(focus intensity(*t*) – background intensity(*t*) \times focus area/background area) \times nuclear intensity(*t*)]/[focus intensity (*t*₀) \times nuclear intensity (*t*₀)]. The time point of induction of the laser-induced damage is extracted from the normalized curve by determining when the maximum change in intensity is achieved between two successive images. The normalized time course from the damage on was fitted to a mono-exponential recovery of the form $y = a(1 - \exp(-k \times t)) + b$ which allows the estimation of the half-time maximum recruitment ($t_{1/2} = (\ln 2)/k$) as well as the expected maximum recruitment ($\max = a + b$).

Immunofluorescence detection of PAR formation

For the detection of polymer formation after exposure to γ -rays cells were plated onto glass coverslips in 6-well plates and 48 h later were exposed to 8 Gy. Three min after the end of the irradiation cells were fixed (4 % formaldehyde in PBS for 25 min). Cells were then washed 3 times with PBS containing 0.1 % Triton X-100, rinsed with PBS alone and re-washed once with PBSMT (PBS with 2 % milk, 0.5 % Triton X-100). After blocking for 30 min at RT with PBSMT, cells were incubated with a primary antibody against poly (ADP-ribose) (Trevigen, clone 10HA, 1/400 dilution in PBSMT) for 1 h at 37 °C. Following washing with PBSMT, slides were incubated with AlexaFluor 488 goat anti rabbit IgG (Molecular Probes, 1/500 dilution in PBSMT) for 1 h at RT. After washing, once with PBSMT and twice with PBS, coverslips were mounted with Vectashield containing DAPI 1.5 μ g/ml (Vector Laboratories). Images of fields were acquired automatically on a Leica confocal SP5 system, using its “tile scan” option, with a 63 \times objective (line average of 4 and zooming set to 4). 300 cells, at least, were analyzed per experimental condition. The global fluorescence intensity by nucleus was quantified in arbitrary units (AU) using Image J software.

Measurements of PARP and PARG activity

Total PARP activity was measured in triplicate as described by Zaremba et al. [26] using 5×10^3 digitonin-permeabilized cells in a reaction mixture containing 350 μ M NAD⁺ and 10 μ g/ml oligonucleotide. After blotting onto a nylon membrane, the PAR was detected following incubation with the primary anti-PAR 10H antibody (ALEXIS Biochemicals, Villeurbanne, France), then with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and finally visualization using the ECL Plus detection kit (GE Healthcare Lifescience, Orsay, France). The luminescent signal was detected and quantified using a G: Box Chemi XL1.4 (Syngene, Frederick, USA). Alternatively, PARP activity of adherent cells was also determined by measuring the incorporation of isotope from ³²P-NAD⁺ into trichloroacetic acid (TCA)-precipitable proteins, as previously described [27]. Briefly cells were seeded in a 6 well plate 24 h prior to the activity assay, the culture media was then removed and the adherent cells overlaid with 1 ml of reaction buffer (56 mM Hepes pH 7.5, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.01 % digitonin, 200 μ g/ml of annealed oligonucleotide (CGGAATTCCG) and 0.125 μ M NAD supplemented with 1.25 μ Ci/ml of ³²P-NAD. Following a 10 min incubation at 37 °C, the cells were scraped on ice and the proteins were precipitated by adding 200 μ l of ice cold 50 % TCA for 4 h. Cells were pelleted, samples were washed three times with 500 μ l of ice cold 5 % TCA and solubilized overnight at 37 °C in 500 μ l of 2 % SDS/0.1 N NaOH and the radioactivity counted in a liquid scintillation counter (TriCarb 2910TR, Perkin Elmer, USA). The PARP activity in the PARP depleted cells in the different cell lines is expressed as a % of the incorporated ³²P-NAD seen in control cells of the corresponding cell line from at least three independent experiments. PARG activity was measured in cell extracts using a commercially available kit (HT Chemiluminescent PARG Assay Kit, Trevigen) that quantitates the loss of biotinylated PAR from histones according to the manufacturers' instructions.

Statistics

Statistical analyses were performed using StatEL software (AD Science, Paris, France) or the VassarStats website (<http://vassarstats.net/>).

Results

Higher levels of polymer detected in PARP-2 depleted HeLa cells

To investigate the impact of PARP-2 depletion in human cells, we first established three stably depleted PARP-2

(PARP-2^{KD}) HeLa clones using an shRNA expression system that targeted two different nucleotide regions. These PARP-2^{KD} cells were cultivated for more than 80 days in culture with levels of the targeted proteins remaining below 1 % of that seen in Control cells, as assessed by the quantification of western blots. The level of PARP-1 protein was unchanged in the three PARP-2^{KD} clones; however, PARG mRNA (Supplementary Fig. 1a) and protein levels (Fig. 1a) were lower in all 3 clones. PARG protein levels were 53 ± 5 % in PARP-2^{KD} clone 1,470/1, 52 ± 7 % in PARP-2^{KD} clone 1,470/7 and 58 ± 9 % in PARP-2^{KD} clone 1,471/13 compared to Control cells based on four independent protein extracts. A reduction in the level of the PARG protein in HeLa PARP-1^{KD} cells (60 ± 8 % compared to Control cells based on 4 independent protein extracts) (Fig. 1a) was also noted in accordance with other studies [28, 29]. Basal PAR levels, as assessed by western blot (Fig. 1b) or immunofluorescence (Fig. 1c) were significantly higher in the PARP-2^{KD} cells compared to Control cells. Induced PAR levels after exposure to IR were also statistically higher in the PARP-2^{KD} cells (clones 1,470/7 and 1,471/13) compared to the HeLa Control cells ($p < 10^{-5}$, $n = 500$ cells). This higher PAR level was associated with lower PARG activity in the 3 PARP-2^{KD} clones ($p = 0.0002$ to $p = 0.001$ depending on the PARP-2^{KD} clone) (Fig. 1d). Under these same experimental conditions, HeLa PARP-1^{KD} cells that have reduced PARG protein levels have a lower PARG activity compared to the Control cells ($p = 0.0015$). We used two different in vitro assays to measure the maximum PARP activity in digitonin-permeabilized cells. With both approaches, we observed that the depletion of PARP-2 resulted in higher levels of PARP activity compared to Control cells (Fig. 1e, f). The difference observed in the PARP activity using a PAR immunodetection-based approach (Fig. 1f) compared to measuring the incorporation of ³²P-NAD⁺ into TCA-precipitable proteins in the HeLa PARP-1^{KD} cells might reflect a difference in assay sensitivity. This low PARP activity in the PARP-1^{KD} cells is less than the 10–15 % contribution to the poly(ribose)lating activity of PARP-2 reported in PARP-1^{-/-} MEFs [4] and PARP-1^{-/-} 3T3 cells [1] and may reflect the nature of the DNA substrate used to activate the different PARPs in in vitro assays that assess the total poly(ribose)lating potential of a cell [1, 26].

The depletion of PARP-2 in HeLa cells modulates the recruitment of PARP-1 and XRCC1

To investigate the impact of higher polymer levels in the HeLa PARP-2 depleted cells, we next investigated the recruitment to and the dissociation from sites of laser-induced damage of fluorescent-tagged PARP-1, XRCC1,

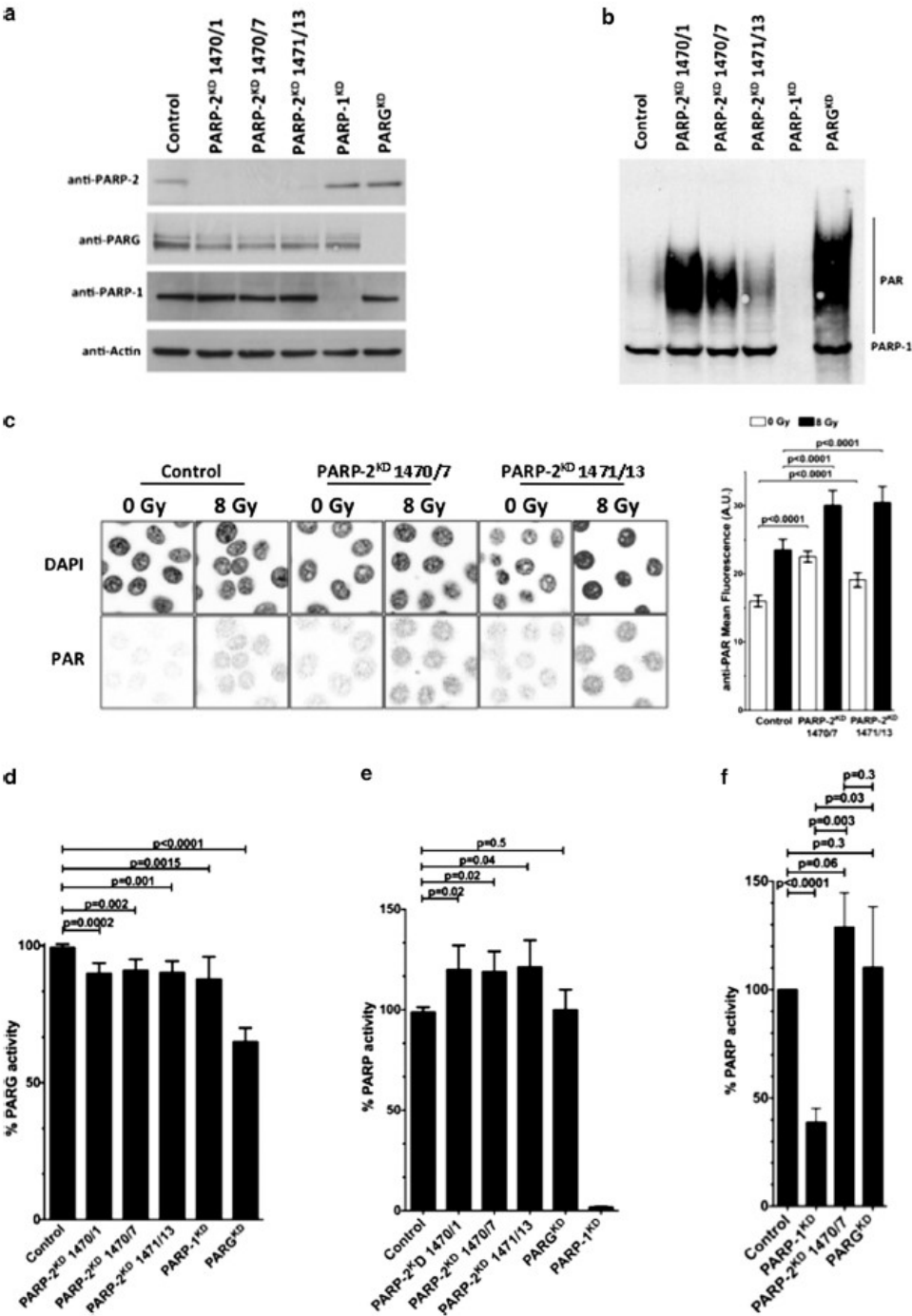


Fig. 1 Modification of PAR levels, PARG, and PARP activity in HeLa PARP-2^{KD} cells. **a** Representative levels of expression of the PARP-2, PARG, and PARP-1 proteins in the different HeLa cell cultures as assessed by western blotting. **b** Polymer levels as assessed by western blotting from untreated cell cultures. **c** Representative images of PAR immunofluorescence in Control cells or PARP-2^{KD} cells before and after exposure to 8 Gy of γ -rays IR and the quantification of the PAR staining. Data represents the mean \pm SD based on the fluorescence intensity in 500 cells/treatment group in two independent experiments. **d** PARG activity measured in protein extracts from the different cell lines, expressed as a % of the activity seen in the Control cells. Data are median \pm 95 % confidence interval for four independent experiments in triplicate and shows that in PARP-2^{KD} cells PARG activity is significantly reduced compared to the Control cells. **e** Maximum PARP activity in permeabilized cells expressed as a % of the activity detected in Control cells showing that the PARP-2^{KD} clones have a significantly higher activity than the Control cells. Data are median \pm 95 % confidence interval for three independent experiments in triplicate. **f** PARP activity in the HeLa PARP-2^{KD} clone 1,470/7 assessed by the incorporation of isotope from ³²P-NAD⁺ into trichloroacetic acid-precipitable proteins, expressed as a % of the activity detected in Control cells, was higher than in Control cells. Data represents the mean \pm SD of four independent experiments

PCNA, and PARG in real time. The EGFP-PARP-1 protein shows a rapid and transient accumulation at the site of damage immediately after micro-irradiation in Control cells (Fig. 2a) as previously described by several groups [7, 25, 30, 31]. In contrast, EGFP-PARP-1 shows a slower and reduced recruitment in the three HeLa PARP-2 depleted cells (57 s for PARP-2^{KD} clone 1,470/1, 58 s for PARP-2^{KD} clone 1,470/7 and 62 s for PARP-2^{KD} 1,471/13 with a maximum relative intensity of 2.43 ± 0.07 , 2.32 ± 0.07 , and 2.26 ± 0.08 , respectively, vs. a maximum relative intensity of 2.96 ± 0.07 reached at 50 s for Control cells $p < 10^{-3}$) (Fig. 2a). These results would suggest that in HeLa cells PARP-2 is necessary for a maximal PARP-1 recruitment to DNA damage sites.

Under the same experimental conditions, XRCC1-YFP recruitment was initially slower and reached lower maximal levels in all three HeLa PARP-2^{KD} clones compared to Control cells (maximal relative spot intensity reached was 4.40 ± 0.16 in PARP2^{KD} clone 1,470/1 ($n = 13$),

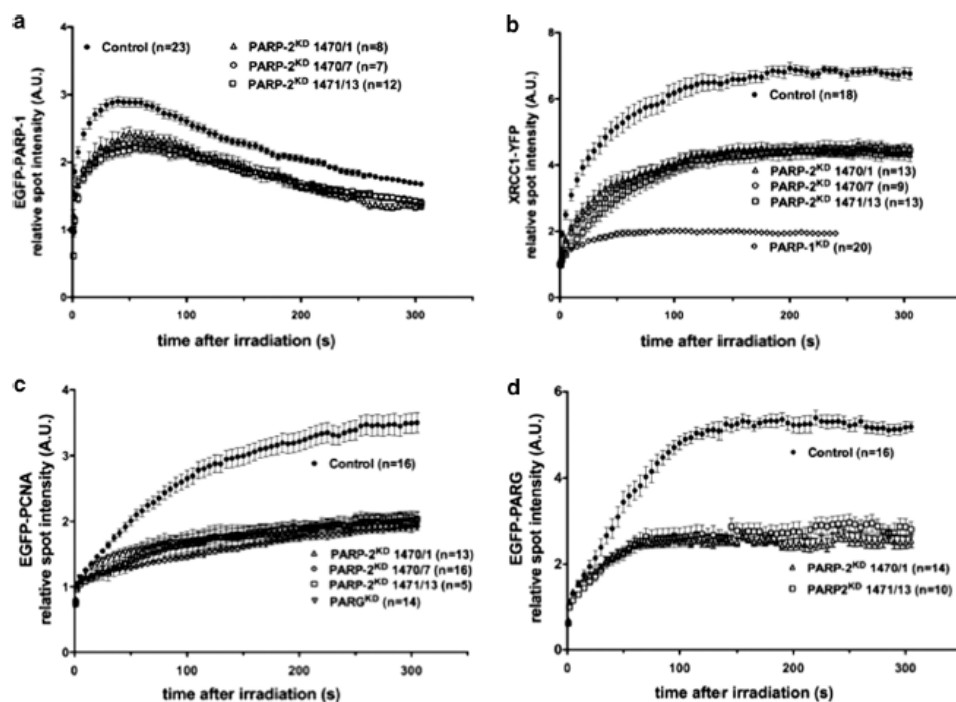


Fig. 2 Recruitment of PARP-1, XRCC1, PCNA, and PARG in HeLa Control and PARP-2^{KD} cells to UVA laser-induced damage sites. Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of **a** EGFP-PARP-1, **b** XRCC1-YFP, **c** EGFP-PCNA, and **d** EGFP-PARG recruitment in Control cells (closed circles) and in the three PARP-2^{KD} clones (open triangles, circles, and squares). For

comparative purposes the recruitment of XRCC1-YFP in HeLa PARP-1^{KD} cells (panel b) and EGFP-PCNA in HeLa PARG^{KD} cells (panel c) are shown. Data represents mean relative spot intensity \pm SEM, $n = 5$ –23 individual cells from a minimum of two independent experiments

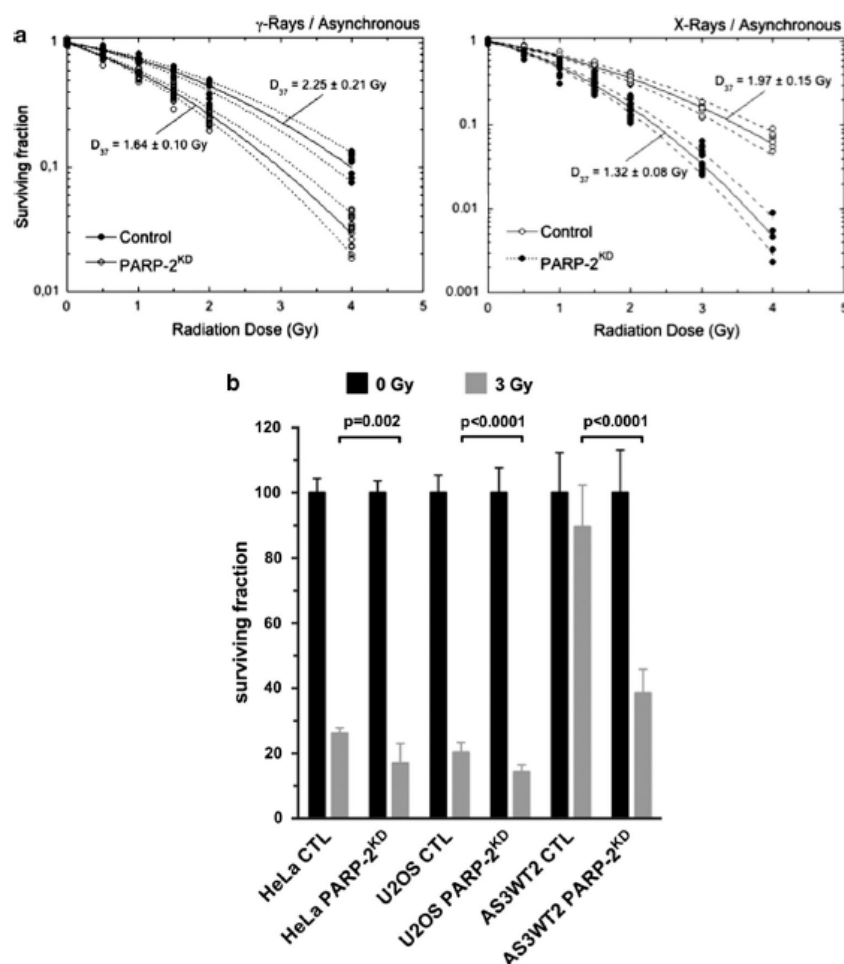
4.52 ± 0.15 in PARP2^{KD} clone 1,470/7 ($n = 9$) and 4.34 ± 0.18 in PARP2^{KD} 1,471/13 ($n = 13$) vs. 6.86 ± 0.16 ($n = 18$) for Control cells). This reduction was not as marked as seen for XRCC1-YFP recruitment in PARP-1^{KD} cells (maximal relative spot intensity reached was 1.83 ± 0.06) (Fig. 2b) but would suggest that the presence of PARP-2 is necessary to obtain the recruitment profile of XRCC1 seen in Control cells. The reasons behind this reduction remain unclear: it could be related to the lower PARP-1 recruitment that impacts directly on XRCC1 recruitment or that the higher nuclear PAR levels in these PARP-2^{KD} cells could impede XRCC1 recruitment to DNA damage sites. A reduced XRCC1 recruitment was also seen in Cdk5-depleted cells that have elevated basal polymer levels [32]. Another possibility is that PARP-2 itself is involved in the recruitment of XRCC1 as PARP-2 has been

shown to interact with XRCC1 [4] and thus in its absence, XRCC1 recruitment would be reduced.

In addition to a reduction in the recruitment of these key BER/SSBR proteins in the absence of PARP-2 in this HeLa cell model, PARP-2 depletion significantly reduced ($p < 0.0001$) the recruitment of GFP-PCNA with recruitment not reaching the levels seen in Control cells (relative spot intensity reached at 300 s was 2.03 ± 0.11 in PARP2^{KD} clone 1,470/1 ($n = 13$), 1.95 ± 0.05 in PARP2^{KD} clone 1,470/7 ($n = 16$), and 2.06 ± 0.08 in PARP2^{KD} 1,471/13 ($n = 5$) vs. 3.53 ± 0.24 ($n = 16$) for Control cells) (Fig. 2c).

It has been previously shown that the recruitment of PARP to DNA damage sites depends not only on PARP-1 and PAR synthesis but also on the interaction of PARP with PCNA [31, 33]. As predicted from the reduced PCNA recruitment observed the maximal levels of EGFP-PARG

Fig. 3 Impact of the depletion of PARP-2 on radiation susceptibility. Clonogenic assays of Control (*open symbols*) and HeLa PARP-2^{KD} cells (*closed symbols*) exposed to increasing doses of a γ -rays or X-rays were performed with asynchronous cell cultures. Data represents mean \pm SD from at least two independent experiments in triplicate. The *solid lines* represent the curves drawn for best fit of data to the linear-quadratic equation (see "Materials and methods"). The *dotted lines* mark the upper and lower limits of the confidence interval drawn from the SDs calculated for the α and β parameters of the linear-quadratic model. **b** Clonogenic cell survival was assessed after exposure to 3 Gy γ -rays in HeLa; U2OS and AS3WT2 cells in which PARP-2 was stably depleted. Statistically lower survival was seen compared to the parental line on the depletion of PARP-2. Data represents the mean \pm SD of four independent experiments



recruitment at the damage site plateaued in the HeLa PARP-2^{KD} cells was about 50 % of the levels seen in the Control cells post-irradiation (maximum relative spot intensity 5.38 ± 0.18 in Control ($n = 16$), 2.55 ± 0.02 in PARP2^{KD} clone 1,470/1 ($n = 14$) and 2.80 ± 0.02 in PARP2^{KD} 1,471/13 ($n = 10$)) (Fig. 2d). A similar kinetic profile was also seen for the recruitment of EGFP-PCNA in a PARP^{KD} HeLa cell line showing that PARP also is required for PCNA recruitment (Fig. 2e).

The PARP-2 protein expression was restored by cultivating the PARP-2^{KD} cells in the absence of hygromycin B for 20 days with a concomitant increase in the expression of the PARP-2 and PARP proteins (Supplementary Fig. 2a). In addition, the increase in PARP activity (Supplementary Fig. 2b), the higher levels of basal polymer levels (Supplementary Fig. 2c) and the reduced GFP-PARP-1 recruitment to sites of laser-induced DNA damage (Supplementary Fig. 2d) were all restored when the cells were grown in the absence of the selective agent hygromycin. Based on the phenotype observed in HeLa cells, it would suggest that PARP-2 plays a role in the regulation of the PARP protein expression and the regulation of PAR metabolism.

PARP-2 depleted cells are sensitive to DNA single and double strand breaks

We next examined the effect of the depletion of PARP-2 on clonogenic survival after exposure of cells to agents that produce DNA strand breaks (Fig. 3a). In asynchronous cultures, the three HeLa PARP-2^{KD} clones showed a significant increase in sensitivity ($p < 10^{-4}$) to the cell killing effects of both ^{137}Cs γ -rays ($D_{37}\text{CTL}/D_{37}\text{PARP-2}^{\text{KD}} = 1.37 \pm 0.21$) and 200 kV X-rays ($D_{37}\text{CTL}/D_{37}\text{PARP-2}^{\text{KD}} = 1.49 \pm 0.20$) with 200 kV X-rays being more efficient than ^{137}Cs γ -rays as expected from their known relative biological efficiency, namely, 1.30 vs. 1.07, respectively, relative to ^{60}Co radiation [34, 35]. Both Control and PARP-2^{KD} cells synchronized in S-phase were more radioresistant than asynchronous cells but the ratio of their D_{37} values ($D_{37}\text{CTL}/D_{37}\text{PARP-2}^{\text{KD}} = 1.60 \pm 0.35$ for ^{137}Cs γ -rays) was not significantly different from that for asynchronous cultures (Supplementary Fig. 1b). These results distinguish cells depleted in PARP-2 from those depleted in PARP-1, as the S-phase radioresistance is negligible in PARP-1 depleted cells as shown by the ratio of the D_{37} values for S-phase vs. asynchronous cultures of 1.04 ± 0.27 for PARP-1^{KD} cells (Supplementary Fig. 1c) compared to 1.39 ± 0.21 for Control cells and 1.19 ± 0.17 for PARP-2^{KD} cells. PARP-2^{KD} clones compared to control cells were also significantly more sensitive to the cell killing effects of NCS, a protein antibiotic that reportedly induces DSBs only in DNA [36, 37], ($[\text{NCS}]_{37}\text{CTL}/$

$[\text{NCS}]_{37}\text{PARP-2}^{\text{KD}} = 1.39 \pm 0.22$) (Supplementary Fig. 1b). Sensitivity to NCS has been previously reported for cells depleted in DNA-PKcs [32], ATM [38] and Artemis [39] but not in HeLa PARP-1^{KD} cells or PARP-1^{KO} MEFs [32, 36]. These results raise the intriguing possibility that the decreased PARP expression and increased PAR level in PARP-2 depleted cells impacts not only on SSB and BER pathways but also on the processing of DNA DSBs in mammalian cells.

The phenotype of PARP-2 depleted U2OS and AS3WT2 cells

To assess whether a similar phenotype was seen in other cell models when PARP-2 was depleted, we used the same shRNA expression system to stably deplete PARP-2 in U2OS and AS3WT2 cells. The U2OS and AS3WT2 cells were chosen because they express similar levels of the PARP2 mRNA as HeLa Control cells (data not shown). The radiation sensitivity was assessed after exposure to 3 Gy using a clonogenic survival assay. The depletion of PARP-2 in all three models (Fig. 4a) resulted in a significant reduction in cell survival compared to PARP-2 expressing HeLa Control cells (26 % compared to 16 %, $p = 0.002$), U2OS (20 % compared to 14 %, $p < 0.0001$) and AS3WT2 (89 % compared to 38 %, $p < 0.0001$) (Fig. 3a). However, no impact on PARP protein levels (Fig. 4a, b), PARP activity (Fig. 4c) or the recruitment of EGFP-PARP-1 and XRCC1-YFP to sites of laser-induced DNA damage sites (Fig. 4d) were noted in either model in direct contrast to the PAR dependent phenotype seen in the PARP-2 depleted HeLa cell line. These results would suggest that the direct interaction of PARP-1 and XRCC1 with PARP-2 [4] could not account for the reduced recruitment observed of both proteins seen in the HeLa PARP-2^{KD} cells. The PARP activity measured in the two model cell lines PARP-2 depleted is not different than the PARP activity measured in the respective control cells expressing the PARP-2 protein ($p < 0.5$ and $p < 0.4$, respectively) (Fig. 4d). These observations suggest that unlike the situation in murine cells where PARP-2 depletion results in a reduced PARP activity measured by a similar method [1, 40] (Fig. 4d), PARP-2 depletion in human cells does not reduce PARP activity.

Discussion

Poly(ADP-ribosyl)ation regulates the activity of many proteins involved in different cellular processes including DNA repair and cell death. While the involvement of PARP-1 in both the BER and SSB pathways as well as DNA DSB repair has been examined, the role of PARP-2

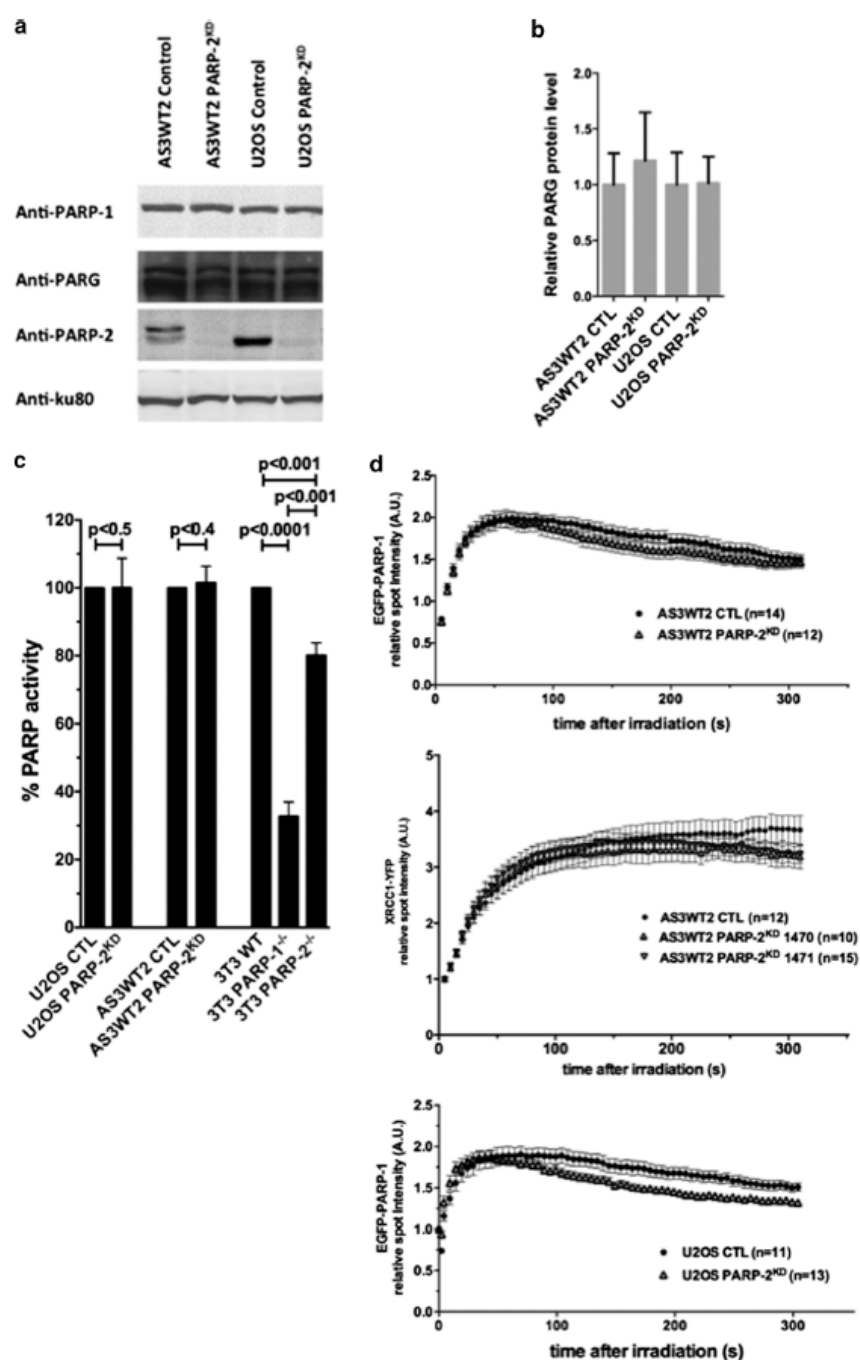


Fig. 4 Impact of the depletion of PARP-2 in U2OS and AS3WT2 cells. The depletion of PARP-2 in U2OS and AS3WT2 cells had no impact on the relative PARG protein level compared to the parental line transfected with a control shRNA **a** was quantified **b** from three independent extracts, or on **c** PARP activity as measured by the incorporation of isotope from $^{32}\text{P-NAD}^+$ into trichloroacetic acid-

precipitable proteins, or **d** the recruitment of EGFP-PARP-1 or XRCC1-YFP to sites of laser-induced DNA damage sites in AS3WT2 PARP-2^{KD} cells or EGFP-PARP-1 in U2OS PARP-2^{KD} cells. The PARP-2 depleted cells used were generated using the shRNA that targeted *PARP2* at nucleotides 829–847 (AS3WT2 PARP-2^{KD} 1470) or at nucleotides 1,077–1,095 (AS3WT2 PARP-2^{KD} 1471)

in these processes is less well characterized. In the present study, we have found that the depletion of PARP-2 using a shRNA construct results in radiosensitivity in the three models examined but that PARP-2 depleted HeLa cells have additional phenotypes that reflect a change in the status quo of the polymer levels that is not seen in the other two models examined. The PAR-related phenotype seen in HeLa cells is robust: it was seen in 3 independent clones cultured for over 20 passages and the concomitant changes associated with increased PAR levels can be reversed on re-expression of PARP-2.

In the HeLa PARP-2^{KD} cells the increased PAR levels are associated with a small but reproducible increase in PARP activity and a decrease in PARG activity associated with a decrease in PARG protein and mRNA levels. An increase in PARP activity in the absence of PARP-2 has previously been reported in thymocytes and stimulated B lymphocytes from *Parp2*^{-/-} mice with a 20 % increase in PAR synthesis compared to Control cells [17, 41, 42]. In contrast while no changes in PARP activity were seen in the U2OS and AS3WT2 cells when PARP-2 was depleted reduced PAR activity was found in PARP2^{-/-} immortalized 3T3 fibroblasts (this study and [1]) and in PARP2^{-/-} MEF cells [1, 4] and PARP-2 depleted MOVAS cells [40]. These results suggest that additional mechanisms exist that regulate PARP activity that involve PARP-2 and appear to be cell type specific. The observation that the in vitro PAR synthesis rate catalyzed in the presence of both PARP-1 and PARP-2 was lower than in the case of PARP-1 alone [4, 43], could suggest the PARP-1/PARP-2 homodimer can downregulate PARP-1 activity or that following activation through binding to DNA structures the poly(ADP-ribosylation) of PARP-1 by PARP-2 impacts on its enzymatic activity [4, 43].

The HeLa PARP-2^{KD} cells also show a robust reduction in PARG expression. It has also been reported that the constitutive suppression of the *Parg* gene in cells using a shRNA approach caused the accumulation of PAR levels [1, 28] and that *Parp1* gene expression and PARP-1 protein expression is downregulated by the knockdown of the *Parg* gene [44, 45]. The balance between these proteins has been shown to influence transcriptional regulation of many genes with PARP-1 and PARG enzymatic activities required for some but not all target genes [29]. Our results would suggest that the impact of PARP-2 on the expression of PARG at the transcriptional level may be cell type specific.

Taken together the results from the three cell models highlight the complex interplay between the PARP-1, PARP-2, and PARG proteins both in terms of their expression and enzymatic activity. Why this PAR-related phenotype is only seen in the HeLa cells and not in the AS3WT2 or U2OS cells is not clear. One possibility is that it is the balance between the expression of the 3 proteins or

their mRNAs that is essential for the observed response and that the depletion of PARP-2 perturbs this balance triggering other changes. In the AS3WT2 or U2OS cells, although the levels of the PARG transcript and protein are lower than the reduced level seen after PARP-2 depletion in HeLa cells this lower level is not sufficient to cause an overall increase in polymer levels suggesting that additional factors control this *status quo*. Transcriptome analysis of the different PARP-2 depleted clones could potentially help to unravel these observations. PARP-1 activity can also be modulated by post-translational modifications. For instance, we have previously shown in HeLa cells that the depletion of the Cdk5 kinase is associated with increased PARP-1 activity resulting in increased polymer levels [32]. Whether differences in such modifications could be underlying these variations could be addressed using an analysis of the PARP-1 protein in the different models by mass spectrometry.

One consequence of PARP-2 depletion that was shared between the three lines was an increased sensitivity to the cell killing effects of IR. While this has not yet been further investigated in the AS3WT2 or U2OS cells, the observation that HeLa PARP-2^{KD} cells show S-phase radioresistance distinguishes them from HeLa PARP-1^{KD} cells [25, 36]. This would suggest that PARP-2 might be implicated in not only the processing of DNA SSBs but also of DSBs generated throughout the cell cycle supported by the observation that the HeLa PARP-2^{KD} cells were sensitive to NCS. Such a role for PARP-2 is supported from animal models. In *Parp2*^{-/-} MEF model, a significant delay in DNA strand break sealing after exposure to MNU, as measured by the Comet assay, was found and *Parp2* KO mice and *Parp2*^{-/-} mouse 3T3 fibroblasts were sensitive to the cell killing effects of IR [3, 46]. While PARP-1 clearly has a role in replication fork restart by homologous recombination and NHEJ (see Robert et al. [13]), the experimental evidence for a role of PARP-2 in DSB repair is sparse [17, 42]. PARP-2 was reported to suppress translocations between c-myc and IgH, which are induced during class switching [17] and impaired T cell receptor rearrangements in mice [42]. In addition, it cannot be ruled out that the increased sensitivity is not, at least in part, a consequence of the deregulated PAR levels found in the absence of PARP-2 that impacts on the choice of DNA repair pathways.

In conclusion, these results highlight the cell type and species-specific phenotypes associated with the depletion of PARP-2 and identify a common feature namely radiation sensitivity. Whether the differences reflect the presence or absence of other enzymatic activities that might modulate overall PARP activity remains to be established but clearly care must be taken on the extrapolation of cellular phenotypes between different cell models.

in these processes is less well characterized. In the present study, we have found that the depletion of PARP-2 using a shRNA construct results in radiosensitivity in the three models examined but that PARP-2 depleted HeLa cells have additional phenotypes that reflect a change in the status quo of the polymer levels that is not seen in the other two models examined. The PAR-related phenotype seen in HeLa cells is robust: it was seen in 3 independent clones cultured for over 20 passages and the concomitant changes associated with increased PAR levels can be reversed on re-expression of PARP-2.

In the HeLa PARP-2^{KD} cells the increased PAR levels are associated with a small but reproducible increase in PARP activity and a decrease in PARG activity associated with a decrease in PARG protein and mRNA levels. An increase in PARP activity in the absence of PARP-2 has previously been reported in thymocytes and stimulated B lymphocytes from *Parp2*^{-/-} mice with a 20 % increase in PAR synthesis compared to Control cells [17, 41, 42]. In contrast while no changes in PARP activity were seen in the U2OS and AS3WT2 cells when PARP-2 was depleted reduced PAR activity was found in PARP2^{-/-} immortalized 3T3 fibroblasts (this study and [1]) and in PARP2^{-/-} MEF cells [1, 4] and PARP-2 depleted MOVAS cells [40]. These results suggest that additional mechanisms exist that regulate PARP activity that involve PARP-2 and appear to be cell type specific. The observation that the in vitro PAR synthesis rate catalyzed in the presence of both PARP-1 and PARP-2 was lower than in the case of PARP-1 alone [4, 43], could suggest the PARP-1/PARP-2 homodimer can downregulate PARP-1 activity or that following activation through binding to DNA structures the poly(ADP-ribose)ylation of PARP-1 by PARP-2 impacts on its enzymatic activity [4, 43].

The HeLa PARP-2^{KD} cells also show a robust reduction in PARG expression. It has also been reported that the constitutive suppression of the *Parg* gene in cells using a shRNA approach caused the accumulation of PAR levels [1, 28] and that *Parp1* gene expression and PARP-1 protein expression is downregulated by the knockdown of the *Parg* gene [44, 45]. The balance between these proteins has been shown to influence transcriptional regulation of many genes with PARP-1 and PARG enzymatic activities required for some but not all target genes [29]. Our results would suggest that the impact of PARP-2 on the expression of PARG at the transcriptional level may be cell type specific.

Taken together the results from the three cell models highlight the complex interplay between the PARP-1, PARP-2, and PARG proteins both in terms of their expression and enzymatic activity. Why this PAR-related phenotype is only seen in the HeLa cells and not in the AS3WT2 or U2OS cells is not clear. One possibility is that it is the balance between the expression of the 3 proteins or

their mRNAs that is essential for the observed response and that the depletion of PARP-2 perturbs this balance triggering other changes. In the AS3WT2 or U2OS cells, although the levels of the PARG transcript and protein are lower than the reduced level seen after PARP-2 depletion in HeLa cells this lower level is not sufficient to cause an overall increase in polymer levels suggesting that additional factors control this *status quo*. Transcriptome analysis of the different PARP-2 depleted clones could potentially help to unravel these observations. PARP-1 activity can also be modulated by post-translational modifications. For instance, we have previously shown in HeLa cells that the depletion of the Cdk5 kinase is associated with increased PARP-1 activity resulting in increased polymer levels [32]. Whether differences in such modifications could be underlying these variations could be addressed using an analysis of the PARP-1 protein in the different models by mass spectrometry.

One consequence of PARP-2 depletion that was shared between the three lines was an increased sensitivity to the cell killing effects of IR. While this has not yet been further investigated in the AS3WT2 or U2OS cells, the observation that HeLa PARP-2^{KD} cells show S-phase radioresistance distinguishes them from HeLa PARP-1^{KD} cells [25, 36]. This would suggest that PARP-2 might be implicated in not only the processing of DNA SSBs but also of DSBs generated throughout the cell cycle supported by the observation that the HeLa PARP-2^{KD} cells were sensitive to NCS. Such a role for PARP-2 is supported from animal models. In *Parp2*^{-/-} MEF model, a significant delay in DNA strand break sealing after exposure to MNU, as measured by the Comet assay, was found and *Parp2* KO mice and *Parp2*^{-/-} mouse 3T3 fibroblasts were sensitive to the cell killing effects of IR [3, 46]. While PARP-1 clearly has a role in replication fork restart by homologous recombination and NHEJ (see Robert et al. [13]), the experimental evidence for a role of PARP-2 in DSB repair is sparse [17, 42]. PARP-2 was reported to suppress translocations between c-myc and IgH, which are induced during class switching [17] and impaired T cell receptor rearrangements in mice [42]. In addition, it cannot be ruled out that the increased sensitivity is not, at least in part, a consequence of the deregulated PAR levels found in the absence of PARP-2 that impacts on the choice of DNA repair pathways.

In conclusion, these results highlight the cell type and species-specific phenotypes associated with the depletion of PARP-2 and identify a common feature namely radiation sensitivity. Whether the differences reflect the presence or absence of other enzymatic activities that might modulate overall PARP activity remains to be established but clearly care must be taken on the extrapolation of cellular phenotypes between different cell models.

Acknowledgments Research in Inserm U612 is supported by funding from Institut Curie and Inserm. MTB had a PhD fellowship from the Presidency of the University of Paris-Sud XI, SC and AF have PhD fellowships from the French Ministry of Research. CB, TZ and MTB were supported by Institut Curie's International Post-doctoral fellow program and TZ by a fellowship from the Fondation Pierre-Gilles de Gennes. The assistance of members of the Institut Curie Small Animal Radiation Platform is gratefully acknowledged.

References

- Ame JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoyer T, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 274(25):17860–17868
- Shieh WM, Ame JC, Wilson MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem* 273(46):30069–30072
- Menissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Ame JC, Dierich A, LeMeur M, Sabatier L, Chambon P, de Murcia G (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J* 22(9):2255–2263
- Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* 277(25):23028–23036
- Beck C, Robert I, Reina-San-Martin B, Schreiber V, Dantzer F (2014) Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Exp Cell Res*. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.003
- Yelamos J, Schreiber V, Dantzer F (2008) Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends in mol med* 14(4):169–178
- Mortusewicz O, Ame JC, Schreiber V, Leonhardt H (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res* 35(22):7665–7675
- Althaus FR, Kleczkowska HE, Malanga M, Muntener CR, Pleschke JM, Ebner M, Auer B (1999) Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. *Mol Cell Biochem* 193(1–2):5–11
- Malanga M, Althaus FR (2004) Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing. *J Biol Chem* 279(7):5244–5248
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev* 7(7):517–528
- Caldecott KW (2003) XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair* 2(9):955–969
- Keil C, Grobe T, Oei SL (2006) MNNG-induced cell death is controlled by interactions between PARP-1, poly(ADP-ribose) glycohydrolase, and XRCC1. *J Biol Chem* 281(45):34394–34405
- Robert I, Karicheva O, Reina San Martin B, Schreiber V, Dantzer F (2013) Functional aspects of PARylation in induced and programmed DNA repair processes: preserving genome integrity and modulating physiological events. *Mol Aspects Med* 34(6):1138–1152. doi:10.1016/j.mam.2013.02.001
- Woodhouse BC, Dianov GL (2008) Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair* 7(7):1077–1086
- Audebert M, Salles B, Weinfeld M, Calsou P (2006) Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *J Mol Biol* 356(2):257–265
- Mansour WY, Rhein T, Dahm-Daphi J (2010) The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res* 38(18):6065–6077
- Robert I, Dantzer F, Reina-San-Martin B (2009) Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 206(5):1047–1056. doi:10.1084/jem.20082468
- Ghodaonkar MM, Zagal N, Kassam S, Rainbow AJ, Shah GM (2008) Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase-1 reduces host cell reactivation of a UV-damaged adenovirus-encoded reporter gene in human dermal fibroblasts. *DNA Repair* 7(4):617–632. doi:10.1016/j.dnarep.2008.01.001
- Pines A, Vrouwe MG, Martijn JA, Typas D, Luijsterburg MS, Cansoy M, Hensbergen P, Deelder A, de Groot A, Matsumoto S, Sugawara K, Thoma N, Vermeulen W, Vrieling H, Mullenders L (2012) PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J cell Biol* 199(2):235–249. doi:10.1083/jcb.201112132
- Biard DS (2007) Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* 35(11):3535–3550
- Biard DS, Despras E, Sarasin A, Angulo JF (2005) Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* 3(9):519–529
- Le Chalony C, Hoffschir F, Gauthier LR, Gross J, Biard DS, Boussin FD, Pennaneach V (2012) Partial complementation of a DNA ligase I deficiency by DNA ligase III and its impact on cell survival and telomere stability in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 69(17):2933–2949. doi:10.1007/s00018-012-0975-8
- Favaudon V (1983) Gamma-radiolysis study of the reductive activation of neocarzinostatin by the carboxyl radical. *Biochimie* 65(11–12):593–607
- Femet M, Megnin-Chanet F, Hall J, Favaudon V (2010) Control of the G2/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: implications for hyper-radiosensitivity. *DNA Repair* 9(1):48–57. doi:10.1016/j.dnarep.2009.10.006
- Godon C, Cordelieres FP, Biard D, Giocanti N, Megnin-Chanet F, Hall J, Favaudon V (2008) PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res* 36(13):4454–4464
- Zaremba T, Thomas HD, Cole M, Coulthard SA, Plummer ER, Curtin NJ (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) pharmacogenetics, activity and expression analysis in cancer patients and healthy volunteers. *Biochem J* 436(3):671–679. doi:10.1042/BJ20101723
- Virag L, Scott GS, Cuzzocrea S, Marmer D, Salzman AL, Szabo C (1998) Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology* 94(3):345–355
- Erdelyi K, Bai P, Kovacs I, Szabo E, Mocsar G, Kakuk A, Szabo C, Gergely P, Virag L (2009) Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. *FASEB J* 23(10):3553–3563. doi:10.1096/fj.09-133264
- Frizzell KM, Gamble MJ, Berrocal JG, Zhang T, Krishnakumar R, Cen Y, Sauve AA, Kraus WL (2009) Global analysis of transcriptional regulation by poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase in MCF-7 human breast cancer

- cells. *J Biol Chem* 284(49):33926–33938. doi:10.1074/jbc.M109.023879
30. Lan L, Nakajima S, Oohata Y, Takao M, Okano S, Masutani M, Wilson SH, Yasui A (2004) In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(38):13738–13743
 31. Mortusewicz O, Fouquier E, Ame JC, Leonhardt H, Schreiber V (2011) PARG is recruited to DNA damage sites through poly(ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms. *Nucleic Acids Res* 39(12):5045–5056
 32. Bolin C, Boudra MT, Fernet M, Vaslin L, Pennaneach V, Zar-emba T, Biard D, Cordelieres FP, Favaudon V, Megnin-Chanet F, Hall J (2011) The impact of cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP-ribose) polymerase activity and responses to radiation. *Cell Mol Life Sci* 69:951–962
 33. Slade D, Dunstan MS, Barkauskaite E, Weston R, Lafite P, Dixon N, Ahel M, Leys D, Ahel I (2011) The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Nature* 477(7366):616–620. doi:10.1038/nature10404
 34. Fu KK, Phillips TL, Heilbron DC, Ross G, Kane LJ (1979) Relative biological effectiveness of low- and high-LET radiotherapy beams for jejunal crypt cell survival at low doses per fraction. *Radiology* 132(1):205–209. doi:10.1148/132.1.205
 35. Nikjoo H, Lindborg L (2010) RBE of low energy electrons and photons. *Phys Med Biol* 55(10):R65–R109. doi:10.1088/0031-9155/55/10/R01
 36. Noel G, Giocanti N, Femet M, Megnin-Chanet F, Favaudon V (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery. *BMC cell biol* 4:7. doi:10.1186/1471-2121-4-7
 37. Ohtsuki K, Ishida N (1975) Neocarzinostatin-induced breakdown of deoxyribonucleic acid in HeLa-S3 cells. *J antibiot* 28(2):143–148
 38. Ziv Y, Bar-Shira A, Pecker I, Russell P, Jorgensen TJ, Tsarfati I, Shiloh Y (1997) Recombinant ATM protein complements the cellular A-T phenotype. *Oncogene* 15(2):159–167. doi:10.1038/sj.onc.1201319
 39. Mohapatra S, Kawahara M, Khan IS, Yannone SM, Povirk LF (2011) Restoration of G1 chemo/radioresistance and double-strand-break repair proficiency by wild-type but not endonuclease-deficient Artemis. *Nucleic Acids Res* 39(15):6500–6510. doi:10.1093/nar/gkr257
 40. Szanto M, Rutkai I, Hegedus C, Czizora A, Rozsahegyi M, Kiss B, Virag L, Gergely P, Toth A, Bai P (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. *Cardiovasc Res* 92(3):430–438. doi:10.1093/cvr/cvr246
 41. Ambrose HE, Willmott S, Beswick RW, Dantzer F, de Murcia JM, Yelamos J, Wagner SD (2009) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1)-deficient mice demonstrate abnormal antibody responses. *Immunology* 127(2):178–186. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02921.x
 42. Yelamos J, Monreal Y, Saenz L, Aguado E, Schreiber V, Mota R, Fuente T, Minguela A, Parrilla P, de Murcia G, Almaraz E, Aparicio P, Menissier-de Murcia J (2006) PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. *EMBO J* 25(18):4350–4360. doi:10.1038/sj.emboj.7601301
 43. Kutuzov MM, Khodyreva SN, Ame JC, Ilina ES, Sukhanova MV, Schreiber V, Lavrik OI (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie* 95(6):1208–1215. doi:10.1016/j.biochi.2013.01.007
 44. Shirai H, Poetsch AR, Gunji A, Maeda D, Fujimori H, Fujihara H, Yoshida T, Ogino H, Masutani M (2013) PARG dysfunction enhances DNA double strand break formation in S-phase after alkylation DNA damage and augments different cell death pathways. *Cell Death Dis* 4:e656. doi:10.1038/cddis.2013.133
 45. Uchiyama F, Watanabe T, Ohta R, Abe H, Tanuma S (2013) PARP1 gene expression is downregulated by knockdown of PARG gene. *Oncol Rep* 29(5):1683–1688. doi:10.3892/or.2013.2321
 46. Huber A, Bai P, de Murcia JM, de Murcia G (2004) PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair* 3(8–9):1103–1108

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, K.E., Medhurst, A.L., Dart, D.A., and Lakin, N.D. (2006). Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene* 25, 3894-3904.
- Adar, S., Izhar, L., Hendel, A., Geacintov, N., and Livneh, Z. (2009). Repair of gaps opposite lesions by homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 37, 5737-5748.
- Agrawal, R.K., Patel, R.K., Shah, V., Nainiwal, L., and Trivedi, B. (2014). Hydroxyurea in sickle cell disease: drug review. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion* 30, 91-96.
- Ahel, D., Horejsi, Z., Wiechens, N., Polo, S.E., Garcia-Wilson, E., Ahel, I., Flynn, H., Skehel, M., West, S.C., Jackson, S.P., *et al.* (2009). Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science* 325, 1240-1243.
- Ahn, K.W., Joo, Y., Choi, Y., Kim, M., Lee, S.H., Cha, S.H., Suh, Y.H., and Kim, H.S. (2008). Swedish amyloid precursor protein mutation increases cell cycle-related proteins in vitro and in vivo. *Journal of neuroscience research* 86, 2476-2487.
- Albert Van Der Kogel, M.C.J. (2009). *Basic Clinical Radiobiology*.
- Anantha, R.W., Sokolova, E., and Borowiec, J.A. (2008). RPA phosphorylation facilitates mitotic exit in response to mitotic DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12903-12908.
- Anantha, R.W., Vassin, V.M., and Borowiec, J.A. (2007). Sequential and Synergistic Modification of Human RPA Stimulates Chromosomal DNA Repair. *Journal of Biological Chemistry* 282, 35910-35923.
- Anglana, M., Apiou, F., Bensimon, A., and Debatisse, M. (2003). Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* 114, 385-394.
- Arif, A. (2012). Extraneuronal activities and regulatory mechanisms of the atypical cyclin-dependent kinase Cdk5. *Biochem Pharmacol* 84, 985-993.
- Ashworth, A., Lord, C.J., and Reis-Filho, J.S. (2011). Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell* 145, 30-38.
- Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 279, 55117-55126.
- Audebert, M., Salles, B., Weinfeld, M., and Calsou, P. (2006). Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *J Mol Biol* 356, 257-265.
- Aye, Y., Li, M., Long, M.J., and Weiss, R.S. (2014). Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies. *Oncogene*.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., *et al.* (2006).

Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-637.

Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A., and Pagano, M. (2008). The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* **134**, 256-267.

Bermejo, R., Lai, M.S., and Foiani, M. (2012). Preventing replication stress to maintain genome stability: resolving conflicts between replication and transcription. *Mol Cell* **45**, 710-718.

Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* **145**, 435-446.

Biard, D.S. (2007). Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* **35**, 3535-3550.

Biard, D.S., Despras, E., Sarasin, A., and Angulo, J.F. (2005). Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Molecular cancer research : MCR* **3**, 519-529.

Binz, S.K., Sheehan, A.M., and Wold, M.S. (2004). Replication Protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair* **3**, 1015-1024.

Bolin, C., Boudra, M.T., Fernet, M., Vaslin, L., Pennaneach, V., Zaremba, T., Biard, D., Cordelieres, F.P., Favaudon, V., Megnin-Chanet, F., *et al.* (2012). The impact of cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP-ribose) polymerase activity and responses to radiation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**, 951-962.

Boohaker, R.J., and Xu, B. (2014). The versatile functions of ATM kinase. *Biomedical journal* **37**, 3-9.

Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *The Journal of experimental medicine* **207**, 855-865.

BOUDRA, M.-T. (2012). Facteurs modulant la radiosensibilité : Rôle des protéines PARP-1, PARP-2 et Cdk5 et implication de la chromatine. In *Agricultural sciences Université Paris Sud -Paris XI, 2011 French <NNT : 2011PA11T096> <tel-00662941>*.

Bowman, E.A., and Kelly, W.G. (2014). RNA Polymerase II transcription elongation and Pol II CTD Ser2 phosphorylation: A tail of two kinases. *Nucleus* **5**, 224-236.

Bracken, A.P., Ciro, M., Cocito, A., and Helin, K. (2004). E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci* **29**, 409-417.

- Branzei, D., and Foiani, M. (2007). Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* 6, 994-1003.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 208-219.
- Brinkkoetter, P.T., Olivier, P., Wu, J.S., Henderson, S., Krofft, R.D., Pippin, J.W., Hockenbery, D., Roberts, J.M., and Shankland, S.J. (2009). Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells. *The Journal of clinical investigation* 119, 3089-3101.
- Brinkkoetter, P.T., Pippin, J.W., and Shankland, S.J. (2010). Cyclin I-Cdk5 governs survival in post-mitotic cells. *Cell Cycle* 9, 1729-1731.
- Bruyere, C., and Meijer, L. (2013). Targeting cyclin-dependent kinases in anti-neoplastic therapy. *Current opinion in cell biology* 25, 772-779.
- Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.-S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., and Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *The EMBO Journal* 28, 2601-2615.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913-917.
- Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., *et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243-254.
- Burrell, R.A., McClelland, S.E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M.C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S.M., Gronroos, E., *et al.* (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494, 492-496.
- Busso, C.S., Wedgeworth, C.M., and Izumi, T. (2011). Ubiquitination of human AP-endonuclease 1 (APE1) enhanced by T233E substitution and by CDK5. *Nucleic Acids Res* 39, 8017-8028.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* 19, 1040-1052.
- Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.L. (2008). Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Accounts of chemical research* 41, 1075-1083.
- Cadoret, J.C., Meisch, F., Hassan-Zadeh, V., Luyten, I., Guillet, C., Duret, L., Quesneville, H., and Prioleau, M.N. (2008). Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15837-15842.

- Calderon-Montano, J.M., Burgos-Moron, E., Orta, M.L., and Lopez-Lazaro, M. (2014). Effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of drugs used in cancer therapy - a review. *Current medicinal chemistry* 21, 3419-3454.
- Carr, A.M., and Lambert, S. (2013). Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J Mol Biol* 425, 4733-4744.
- Carty, M.P., Zernik-Kobak, M., McGrath, S., and Dixon, K. (1994). UV light-induced DNA synthesis arrest in HeLa cells is associated with changes in phosphorylation of human single-stranded DNA-binding protein. *EMBO J* 13, 2114-2123.
- Chabosseu, P., Buhagiar-Labarchede, G., Onclercq-Delic, R., Lambert, S., Debatisse, M., Brison, O., and Amor-Gueret, M. (2011). Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nature communications* 2, 368.
- Chae, T., Kwon, Y.T., Bronson, R., Dikkes, P., Li, E., and Tsai, L.H. (1997). Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18, 29-42.
- Chanoux, R.A., Yin, B., Urtishak, K.A., Asare, A., Bassing, C.H., and Brown, E.J. (2009). ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *J Biol Chem* 284, 5994-6003.
- Chen, H., Lisby, M., and Symington, L.S. (2013). RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Mol Cell* 50, 589-600.
- Chen, H.R., Lin, G.T., Huang, C.K., and Fann, M.J. (2014). Cdk12 and Cdk13 regulate axonal elongation through a common signaling pathway that modulates Cdk5 expression. *Experimental neurology* 261C, 10-21.
- Chiruvella, K.K., Liang, Z., and Wilson, T.E. (2013). Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a012757.
- Choi, J.H., Lindsey-Boltz, L.A., Kemp, M., Mason, A.C., Wold, M.S., and Sancar, A. (2010). Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13660-13665.
- Chowdhury, D., Choi, Y.E., and Brault, M.E. (2013). Charity begins at home: non-coding RNA functions in DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 181-189.
- Cicenas, J., and Valius, M. (2011). The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of cancer research and clinical oncology* 137, 1409-1418.
- Cobb, J.A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J.A., and Gasser, S.M. (2005). Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev* 19, 3055-3069.
- Collins, A., and Oates, D.J. (1987). Hydroxyurea: effects on deoxyribonucleotide pool sizes correlated with effects on DNA repair in mammalian cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 169, 299-305.
- Conti, C., Seiler, J.A., and Pommier, Y. (2007). The mammalian DNA replication elongation checkpoint: implication of Chk1 and relationship with

origin firing as determined by single DNA molecule and single cell analyses. *Cell Cycle* 6, 2760-2767.

Contreras-Vallejos, E., Utreras, E., and Gonzalez-Billault, C. (2012). Going out of the brain: Non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5. *Cellular Signalling* 24, 44-52.

Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299, 35-55.

Costantino, L., Sotiriou, S.K., Rantala, J.K., Magin, S., Mladenov, E., Helleday, T., Haber, J.E., Iliakis, G., Kallioniemi, O.P., and Halazonetis, T.D. (2014). Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science* 343, 88-91.

Couch, F.B., Bansbach, C.E., Driscoll, R., Luzwick, J.W., Glick, G.G., Betous, R., Carroll, C.M., Jung, S.Y., Qin, J., Cimprich, K.A., *et al.* (2013). ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev* 27, 1610-1623.

Couch, F.B., and Cortez, D. (2014). Fork reversal, too much of a good thing. *Cell Cycle* 13, 1049-1050.

Couedel, C., Mills, K.D., Barchi, M., Shen, L., Olshen, A., Johnson, R.D., Nussenzweig, A., Essers, J., Kanaar, R., Li, G.C., *et al.* (2004). Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes Dev* 18, 1293-1304.

Courapied, S., Sellier, H., de Carne Trecesson, S., Vigneron, A., Bernard, A.C., Gamelin, E., Barre, B., and Coqueret, O. (2010). The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition. *J Biol Chem* 285, 26765-26778.

Cruz-Garcia, A., Lopez-Saavedra, A., and Huertas, P. (2014). BRCA1 Accelerates CtIP-Mediated DNA-End Resection. *Cell Rep* 9, 451-459.

Cuadrado, M., Martinez-Pastor, B., and Fernandez-Capetillo, O. (2006). "ATR activation in response to ionizing radiation: still ATM territory". *Cell division* 1, 7.

Daley, J.M., Gaines, W.A., Kwon, Y., and Sung, P. (2014). Regulation of DNA Pairing in Homologous Recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.

Daley, J.M., and Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 34, 1380-1388.

De Boer, L., Oakes, V., Beamish, H., Giles, N., Stevens, F., Somodevilla-Torres, M., Desouza, C., and Gabrielli, B. (2008). Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene* 27, 4261-4268.

De Piccoli, G., Katou, Y., Itoh, T., Nakato, R., Shirahige, K., and Labib, K. (2012). Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases. *Mol Cell* 45, 696-704.

- Deem, A., Keszthelyi, A., Blackgrove, T., Vayl, A., Coffey, B., Mathur, R., Chabes, A., and Malkova, A. (2011). Break-induced replication is highly inaccurate. *PLoS Biol* 9, e1000594.
- Demelash, A., Rudrabhatla, P., Pant, H.C., Wang, X., Amin, N.D., McWhite, C.D., Naizhen, X., and Linnoila, R.I. (2012). Achaete-scute homologue-1 (ASH1) stimulates migration of lung cancer cells through Cdk5/p35 pathway. *Molecular biology of the cell* 23, 2856-2866.
- Demetrick, D.J., Zhang, H., and Beach, D.H. (1994). Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4, and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenetics and cell genetics* 66, 72-74.
- Denis, B. (2011). New Insight on Entangled DNA Repair Pathways: Stable Silenced Human Cells for Unraveling the DDR Jigsaw.
- Depamphilis, M.L., de Renty, C.M., Ullah, Z., and Lee, C.Y. (2012). "The Octet": Eight Protein Kinases that Control Mammalian DNA Replication. *Frontiers in physiology* 3, 368.
- Deshpande, R.A., Williams, G.J., Limbo, O., Williams, R.S., Kuhnlein, J., Lee, J.H., Classen, S., Guenther, G., Russell, P., Tainer, J.A., *et al.* (2014). ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *EMBO J* 33, 482-500.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Dick, F.A., and Rubin, S.M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 297-306.
- Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J., and Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448, 445-451.
- Dungey, F.A., Loser, D.A., and Chalmers, A.J. (2008). Replication-dependent radiosensitization of human glioma cells by inhibition of poly(ADP-Ribose) polymerase: mechanisms and therapeutic potential. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 72, 1188-1197.
- Dutta, A., and Stillman, B. (1992). cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DNA replication factor, RPA, and activate DNA replication. *EMBO J* 11, 2189-2199.
- Eggers, J.P., Grandgenett, P.M., Collisson, E.C., Lewallen, M.E., Tremayne, J., Singh, P.K., Swanson, B.J., Andersen, J.M., Caffrey, T.C., High, R.R., *et al.* (2011). Cyclin-dependent kinase 5 is amplified and overexpressed in pancreatic cancer and activated by mutant K-Ras. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6140-6150.
- Enders, G.H. (2012). Mammalian interphase cdks: dispensable master regulators of the cell cycle. *Genes & cancer* 3, 614-618.

- Engstrom, Y., Rozell, B., Hansson, H.A., Stemme, S., and Thelander, L. (1984). Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells. *EMBO J* 3, 863-867.
- Ezhevsky, S.A., Ho, A., Becker-Hapak, M., Davis, P.K., and Dowdy, S.F. (2001). Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Mol Cell Biol* 21, 4773-4784.
- Ezhevsky, S.A., Nagahara, H., Vocero-Akbani, A.M., Gius, D.R., Wei, M.C., and Dowdy, S.F. (1997). Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10699-10704.
- Fairman, M.P., and Stillman, B. (1988). Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. *EMBO J* 7, 1211-1218.
- Falck, J., Forment, J.V., Coates, J., Mistrik, M., Lukas, J., Bartek, J., and Jackson, S.P. (2012). CDK targeting of NBS1 promotes DNA-end resection, replication restart and homologous recombination. *EMBO Reports* 13, 561-568.
- Falck, J., Petrini, J.H., Williams, B.R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nature genetics* 30, 290-294.
- Fang, F., and Newport, J.W. (1993). Distinct roles of cdk2 and cdc2 in RP-A phosphorylation during the cell cycle. *Journal of Cell Science* 106, 983-994.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917-921.
- Feldmann, G., Mishra, A., Hong, S.M., Bisht, S., Strock, C.J., Ball, D.W., Goggins, M., Maitra, A., and Nelkin, B.D. (2010). Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. *Cancer Res* 70, 4460-4469.
- Fernandez-Capetillo, O., and Nussenzweig, A. (2013). Naked replication forks break apRPA. *Cell* 155, 979-980.
- Fernet, M., Megnin-Chanet, F., Hall, J., and Favaudon, V. (2010). Control of the G2/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: implications for hyper-radiosensitivity. *DNA Repair (Amst)* 9, 48-57.
- Fernet, M.C., S. Hall, J. (2013). DNA Repair and Cancer: From Bench to Clinic.
- Forment, J.V., Blasius, M., Guerini, I., and Jackson, S.P. (2011). Structure-specific DNA endonuclease Mus81/Eme1 generates DNA damage caused by Chk1 inactivation. *PLoS One* 6, e23517.
- Fotedar, R., and Roberts, J.M. (1992). Cell cycle regulated phosphorylation of RPA-32 occurs within the replication initiation complex. *EMBO J* 11, 2177-2187.
- Futatsugi, A., Utreras, E., Rudrabhatla, P., Jaffe, H., Pant, H.C., and Kulkarni, A.B. (2012). Cyclin-dependent kinase 5 regulates E2F transcription factor through phosphorylation of Rb protein in neurons. *Cell Cycle* 11, 1603-1610.

- Gagné, J.-P., Moreel, X., Gagné, P., Labelle, Y., Droit, A., Chevalier-Paré, M.I., Bourassa, S., McDonald, D., Hendzel, M.J., Prigent, C., *et al.* (2009). Proteomic Investigation of Phosphorylation Sites in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase. *Journal of Proteome Research* 8, 1014-1029.
- Gagne, J.P., Moreel, X., Gagne, P., Labelle, Y., Droit, A., Chevalier-Pare, M., Bourassa, S., McDonald, D., Hendzel, M.J., Prigent, C., *et al.* (2009). Proteomic investigation of phosphorylation sites in poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J Proteome Res* 8, 1014-1029.
- Ge, X.Q., and Blow, J.J. (2010). Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J Cell Biol* 191, 1285-1297.
- Gilmore, E.C., Ohshima, T., Goffinet, A.M., Kulkarni, A.B., and Herrup, K. (1998). Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 6370-6377.
- Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., and Jackson, S.P. (2003). MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 952-956.
- Gong, D., and Ferrell, J.E., Jr. (2010). The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events. *Molecular biology of the cell* 21, 3149-3161.
- Goodarzi, A.A., and Jeggo, P.A. (2012). The heterochromatic barrier to DNA double strand break repair: how to get the entry visa. *International journal of molecular sciences* 13, 11844-11860.
- Gottipati, P., Cassel, T.N., Savolainen, L., and Helleday, T. (2008). Transcription-associated recombination is dependent on replication in Mammalian cells. *Mol Cell Biol* 28, 154-164.
- Gottschalk, A.J., Timinszky, G., Kong, S.E., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Florens, L., Ladurner, A.G., Conaway, J.W., *et al.* (2009). Poly(ADP-ribosylation) directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13770-13774.
- Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., and Lopez, B.S. (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res* 2, 249-268.
- Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S.M., Bertrand, P., Hickson, I.D., and Lopez, B.S. (2013). A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell Rep* 5, 21-28.
- Guidato, S., McLoughlin, D.M., Grierson, A.J., and Miller, C.C. (1998). Cyclin D2 interacts with cdk-5 and modulates cellular cdk-5/p35 activity. *Journal of neurochemistry* 70, 335-340.

- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 Pathway on NHEJ-Induced Genome Rearrangements in Mammalian Cells. *Molecular Cell* 14, 611-623.
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., and Lopez, B.S. (2008). S-phase progression stimulates both the mutagenic KU-independent pathway and mutagenic processing of KU-dependent intermediates, for nonhomologous end joining. *Oncogene* 27, 1726-1736.
- Guo, Z., and Stiller, J.W. (2004). Comparative genomics of cyclin-dependent kinases suggest co-evolution of the RNAP II C-terminal domain and CTD-directed CDKs. *BMC genomics* 5, 69.
- Haberichter, T., Madge, B., Christopher, R.A., Yoshioka, N., Dhiman, A., Miller, R., Gendelman, R., Aksenov, S.V., Khalil, I.G., and Dowdy, S.F. (2007). A systems biology dynamical model of mammalian G1 cell cycle progression. *Molecular systems biology* 3, 84.
- Haddy, N., Tartier, L., Koscielny, S., Adjadj, E., Rubino, C., Brugieres, L., Pacquement, H., Diallo, I., de Vathaire, F., Averbeck, D., *et al.* (2014). Repair of ionizing radiation-induced DNA damage and risk of second cancer in childhood cancer survivors. *Carcinogenesis* 35, 1745-1749.
- Hamdane, M., Bretteville, A., Sambo, A.V., Schindowski, K., Begard, S., Delacourte, A., Bertrand, P., and Buee, L. (2005). p25/Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death. *J Cell Sci* 118, 1291-1298.
- Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S.L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H.B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I.D., and Kanaar, R. (2007). The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1096-1104.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hartwell, L.H. (2002). Nobel Lecture. Yeast and cancer. *Bioscience reports* 22, 373-394.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46-51.
- He, Z., Henriksen, L.A., Wold, M.S., and Ingles, C.J. (1995). RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* 374, 566-569.
- Helal, C.J., Kang, Z., Lucas, J.C., Gant, T., Ahlijanian, M.K., Schachter, J.B., Richter, K.E., Cook, J.M., Menniti, F.S., Kelly, K., *et al.* (2009). Potent and cellularly active 4-aminoimidazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 5/p25 for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19, 5703-5707.

- Helleday, T. (2003). Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation research* 532, 103-115.
- Helleday, T. (2011). The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: Clearing up the misunderstandings. *Molecular Oncology* 5, 387-393.
- Hellmich, M.R., Pant, H.C., Wada, E., and Battey, J.F. (1992). Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10867-10871.
- Hernandez-Ortega, K., Ferrera, P., and Arias, C. (2007). Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *Journal of neuroscience research* 85, 1744-1751.
- Hirose, Y., and Ohkuma, Y. (2007). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *Journal of biochemistry* 141, 601-608.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hsu, F.N., Chen, M.C., Chiang, M.C., Lin, E., Lee, Y.T., Huang, P.H., Lee, G.S., and Lin, H. (2011). Regulation of androgen receptor and prostate cancer growth by cyclin-dependent kinase 5. *J Biol Chem* 286, 33141-33149.
- Hsu, F.N., Chen, M.C., Lin, K.C., Peng, Y.T., Li, P.C., Lin, E., Chiang, M.C., Hsieh, J.T., and Lin, H. (2013). Cyclin-dependent kinase 5 modulates STAT3 and androgen receptor activation through phosphorylation of Ser(7)(2)(7) on STAT3 in prostate cancer cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 305, E975-986.
- Huang, E., Qu, D., Zhang, Y., Venderova, K., Haque, M.E., Rousseaux, M.W.C., Slack, R.S., Woulfe, J.M., and Park, D.S. (2010). The role of Cdk5-mediated apurinic/aprimidinic endonuclease 1 phosphorylation in neuronal death. *Nature Cell Biology* 12, 563-571.
- Huang, S.H., Xiong, M., Chen, X.P., Xiao, Z.Y., Zhao, Y.F., and Huang, Z.Y. (2008). PJ34, an inhibitor of PARP-1, suppresses cell growth and enhances the suppressive effects of cisplatin in liver cancer cells. *Oncology reports* 20, 567-572.
- Huertas, P. (2010). DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* 17, 11-16.
- Huhn, D., Bolck, H.A., and Sartori, A.A. (2013). Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy. *Swiss medical weekly* 143, w13837.
- Humbert, S., Dhavan, R., and Tsai, L. (2000). p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 113 (Pt 6), 975-983.
- Humphreys, T.D.a.W., Marc S, (2010). Eukaryotic Replication Protein A, in *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.

- Hunt, T. (2002). Nobel Lecture. Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions. *Bioscience reports* 22, 465-486.
- Hustedt, N., Gasser, S.M., and Shimada, K. (2013). Replication checkpoint: tuning and coordination of replication forks in s phase. *Genes (Basel)* 4, 388-434.
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., and Wang, H. (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22, 5834-5847.
- Issaeva, N., Thomas, H.D., Djurenovic, T., Jaspers, J.E., Stoimenov, I., Kyle, S., Pedley, N., Gottipati, P., Zur, R., Sleeth, K., *et al.* (2010). 6-Thioguanine Selectively Kills BRCA2-Defective Tumors and Overcomes PARP Inhibitor Resistance. *Cancer Research* 70, 6268-6276.
- Iyer, D.R., and Rhind, N. (2013). Checkpoint regulation of replication forks: global or local? *Biochemical Society transactions* 41, 1701-1705.
- Jacob, D.A., Bahra, M., Langrehr, J.M., Boas-Knoop, S., Stefaniak, R., Davis, J., Schumacher, G., Lippert, S., and Neumann, U.P. (2007). Combination therapy of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide and gemcitabine shows strong antitumor activity in pancreatic cancer cells. *Journal of gastroenterology and hepatology* 22, 738-748.
- Jin, J.K., Tien, P.C., Cheng, C.J., Song, J.H., Huang, C., Lin, S.H., and Gallick, G.E. (2014). Talin1 phosphorylation activates beta1 integrins: a novel mechanism to promote prostate cancer bone metastasis. *Oncogene*.
- Jones, R.M., Mortusewicz, O., Afzal, I., Lorvellec, M., Garcia, P., Helleday, T., and Petermann, E. (2013). Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* 32, 3744-3753.
- Jones, R.M., and Petermann, E. (2012). Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochemical Journal* 443, 13-26.
- Josse, R., Martin, S.E., Guha, R., Ormanoglu, P., Pfister, T.D., Reaper, P.M., Barnes, C.S., Jones, J., Charlton, P.A., Pollard, J.R., *et al.* (2014). The ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res.*
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., and Lahav, G. (2012). Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol Cell* 47, 320-329.
- Kasten, M., and Giordano, A. (2001). Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* 20, 1832-1838.
- Katsuno, Y., Suzuki, A., Sugimura, K., Okumura, K., Zineldeen, D.H., Shimada, M., Niida, H., Mizuno, T., Hanaoka, F., and Nakanishi, M. (2009). Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3184-3189.

- Kavli, B., Otterlei, M., Slupphaug, G., and Krokan, H.E. (2007). Uracil in DNA-general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst)* 6, 505-516.
- Khanna, K.K., Shiloh, Yosef (2009). The DNA Damage Response: Implications on Cancer Formation and Treatment.
- Kikuchi, K., Abdel-Aziz, H.I., Taniguchi, Y., Yamazoe, M., Takeda, S., and Hirota, K. (2009). Bloom DNA helicase facilitates homologous recombination between diverged homologous sequences. *J Biol Chem* 284, 26360-26367.
- Kim, D., Frank, C.L., Dobbin, M.M., Tsunemoto, R.K., Tu, W., Peng, P.L., Guan, J.S., Lee, B.H., Moy, L.Y., Giusti, P., *et al.* (2008). Dereglulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity. *Neuron* 60, 803-817.
- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E., and Kastan, M.B. (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* 274, 37538-37543.
- Kim, Y.C., Gerlitz, G., Furusawa, T., Catez, F., Nussenzweig, A., Oh, K.S., Kraemer, K.H., Shiloh, Y., and Bustin, M. (2009). Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage. *Nat Cell Biol* 11, 92-96.
- Knockaert, M., Greengard, P., and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in pharmacological sciences* 23, 417-425.
- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., Li, E., and Tsai, L.H. (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 6758-6771.
- Kobayashi, H., Saito, T., Sato, K., Furusawa, K., Hosokawa, T., Tsutsumi, K., Asada, A., Kamada, S., Ohshima, T., and Hisanaga, S. (2014). Phosphorylation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) at Tyr-15 is inhibited by Cdk5 activators and does not contribute to the activation of Cdk5. *J Biol Chem* 289, 19627-19636.
- Koundrioukoff, S., Jonsson, Z.O., Hasan, S., de Jong, R.N., van der Vliet, P.C., Hottiger, M.O., and Hubscher, U. (2000). A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J Biol Chem* 275, 22882-22887.
- Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. (2010). Treslin collaborates with TopBP1 in triggering the initiation of DNA replication. *Cell* 140, 349-359.
- Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. (2000). Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* 275, 17166-17172.
- Lahkim Bennani-Belhaj, K., Rouzeau, S., Buhagiar-Labarchede, G., Chabosseau, P., Onclercq-Delic, R., Bayart, E., Cordelieres, F., Couturier, J., and Amor-Gueret, M. (2010). The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Molecular cancer research : MCR* 8, 385-394.

- Lalioti, V., Pulido, D., and Sandoval, I.V. (2010). Cdk5, the multifunctional surveyor. *Cell Cycle* 9, 284-311.
- Lambert, S., and Carr, A.M. (2013a). Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma* 122, 33-45.
- Lambert, S., and Carr, A.M. (2013b). Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models. *Current opinion in genetics & development* 23, 132-139.
- Larue, L., and Bellacosa, A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24, 7443-7454.
- Le Tourneau, C., Faivre, S., Laurence, V., Delbaldo, C., Vera, K., Girre, V., Chiao, J., Armour, S., Frame, S., Green, S.R., *et al.* (2010). Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *European journal of cancer* 46, 3243-3250.
- Leatherbarrow, E.L., Harper, J.V., Cucinotta, F.A., and O'Neill, P. (2006). Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation. *International journal of radiation biology* 82, 111-118.
- Lee, A.Y., Chiba, T., Truong, L.N., Cheng, A.N., Do, J., Cho, M.J., Chen, L., and Wu, X. (2012). Dbf4 is direct downstream target of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) protein to regulate intra-S-phase checkpoint. *J Biol Chem* 287, 2531-2543.
- Lee, J.H., and Kim, K.T. (2007). Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and p53 by ERK1/2 pathway in the DNA damage-induced neuronal death. *Journal of cellular physiology* 210, 784-797.
- Lee, J.H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-554.
- Lee, K.Y., Mummery, A., Park, J., Tariq, H., and Rosales, J.L. (2010). Localization of CDK5 in the midbody and increased aneuploidy in CDK5-/- cells. *Cell Cycle* 9, 3629-3630.
- Lee, K.Y., Rosales, J.L., Lee, B.C., Chung, S.H., Fukui, Y., Lee, N.S., Lee, K.Y., and Jeong, Y.G. (2004). Cdk5/p35 expression in the mouse ovary. *Molecules and cells* 17, 17-22.
- Lee, M.S., Kwon, Y.T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R.M., and Tsai, L.H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360-364.
- Leman, A.R., and Noguchi, E. (2013). The replication fork: understanding the eukaryotic replication machinery and the challenges to genome duplication. *Genes (Basel)* 4, 1-32.
- Leonard, A.C., and Mechali, M. (2013). DNA replication origins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a010116.

- Levacque, Z., Rosales, J.L., and Lee, K.Y. (2012). Level of cdk5 expression predicts the survival of relapsed multiple myeloma patients. *Cell Cycle* 11, 4093-4095.
- Lew, J., and Wang, J.H. (1995). Neuronal cdc2-like kinase. *Trends Biochem Sci* 20, 33-37.
- Li, B.S., Ma, W., Jaffe, H., Zheng, Y., Takahashi, S., Zhang, L., Kulkarni, A.B., and Pant, H.C. (2003). Cyclin-dependent kinase-5 is involved in neuregulin-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity mediating neuronal survival. *J Biol Chem* 278, 35702-35709.
- Li, B.S., Zhang, L., Takahashi, S., Ma, W., Jaffe, H., Kulkarni, A.B., and Pant, H.C. (2002). Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *EMBO J* 21, 324-333.
- Liang, Q., Li, L., Zhang, J., Lei, Y., Wang, L., Liu, D.X., Feng, J., Hou, P., Yao, R., Zhang, Y., *et al.* (2013). CDK5 is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Scientific reports* 3, 2932.
- Liebl, J., Furst, R., Vollmar, A.M., and Zahler, S. (2011). Twice switched at birth: cell cycle-independent roles of the "neuron-specific" cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in non-neuronal cells. *Cell Signal* 23, 1698-1707.
- Lim, H.Y., Seow, K.T., Li, Q., Kesuma, D., Wang, J.H., and Qi, R.Z. (2001). Structural Insights into Cdk5 activation by a neuronal Cdk5 activator. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 77-83.
- Lim, Y.C., Roberts, T.L., Day, B.W., Harding, A., Kozlov, S., Kijas, A.W., Ensbey, K.S., Walker, D.G., and Lavin, M.F. (2012). A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. *Molecular cancer therapeutics* 11, 1863-1872.
- Lin, H., Chen, M.C., Chiu, C.Y., Song, Y.M., and Lin, S.Y. (2007). Cdk5 regulates STAT3 activation and cell proliferation in medullary thyroid carcinoma cells. *J Biol Chem* 282, 2776-2784.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- Liu, C., Srihari, S., Cao, K.A., Chenevix-Trench, G., Simpson, P.T., Ragan, M.A., and Khanna, K.K. (2014). A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy. *Nucleic Acids Res* 42, 6106-6127.
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., and Heyer, W.D. (2010). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1260-1262.
- Liu, J.L., Wang, X.Y., Huang, B.X., Zhu, F., Zhang, R.G., and Wu, G. (2011). Expression of CDK5/p35 in resected patients with non-small cell lung cancer: relation to prognosis. *Medical oncology* 28, 673-678.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., *et al.* (2000). Chk1 is an essential

- kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* *14*, 1448-1459.
- Liu, S., Bekker-Jensen, S., Mairland, N., Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol* *26*, 6056-6064.
- Liu, V.F., and Weaver, D.T. (1993). The ionizing radiation-induced replication protein A phosphorylation response differs between ataxia telangiectasia and normal human cells. *Mol Cell Biol* *13*, 7222-7231.
- Liu, X., Zhou, B., Xue, L., Shih, J., Tye, K., Qi, C., and Yen, Y. (2005). The ribonucleotide reductase subunit M2B subcellular localization and functional importance for DNA replication in physiological growth of KB cells. *Biochem Pharmacol* *70*, 1288-1297.
- Ljungman, M., and Paulsen, M.T. (2001). The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Molecular pharmacology* *60*, 785-789.
- Lolli, G., and Johnson, L.N. (2005). CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* *4*, 572-577.
- Longhese, M.P., Neecke, H., Paciotti, V., Lucchini, G., and Plevani, P. (1996). The 70 kDa subunit of replication protein A is required for the G1/S and intra-S DNA damage checkpoints in budding yeast. *Nucleic Acids Res* *24*, 3533-3537.
- Loor, G., Zhang, S.J., Zhang, P., Toomey, N.L., and Lee, M.Y. (1997). Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Res* *25*, 5041-5046.
- Lopes, J.P., and Agostinho, P. (2011). Cdk5: multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol* *94*, 49-63.
- Lord, C.J., Tutt, A.N., and Ashworth, A. (2014). Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors. *Annual review of medicine*.
- Lucca, C., Vanoli, F., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Haber, J., and Foiani, M. (2004). Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. *Oncogene* *23*, 1206-1213.
- Lundin, C., Erixon, K., Arnaudeau, C., Schultz, N., Jenssen, D., Meuth, M., and Helleday, T. (2002). Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Mol Cell Biol* *22*, 5869-5878.
- Machon, C., Jordheim, L.P., Puy, J.Y., Lefebvre, I., Dumontet, C., and Guitton, J. (2014). Fully validated assay for the quantification of endogenous nucleoside mono- and triphosphates using online extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* *406*, 2925-2941.

- Magdalou, I., Lopez, B.S., Pasero, P., and Lambert, S.A. (2014). The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Seminars in cell & developmental biology* 30, 154-164.
- Maggiorella, L., Deutsch, E., Frascogna, V., Chavaudra, N., Jeanson, L., Milliat, F., Eschwege, F.t., and Bourhis, J. (2003). Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer research* 63, 2513-2517.
- Malinsky, J., Koberna, K., Stanek, D., Masata, M., Votruba, I., and Raska, I. (2001). The supply of exogenous deoxyribonucleotides accelerates the speed of the replication fork in early S-phase. *J Cell Sci* 114, 747-750.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.H., and Wolgemuth, D.J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* 11, 1275-1276.
- Malyarchuk, S., Castore, R., and Harrison, L. (2008). DNA repair of clustered lesions in mammalian cells: involvement of non-homologous end-joining. *Nucleic Acids Res* 36, 4872-4882.
- Mariaule, G., and Belmont, P. (2014). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Marketed Anticancer Drugs: Where Are We Now? A Short Survey. *Molecules* 19, 14366-14382.
- Martinez, T.F., Phillips, J.W., Karanja, K.K., Polaczek, P., Wang, C.M., Li, B.C., Campbell, J.L., and Dervan, P.B. (2015). Replication stress by Py-Im polyamides induces a non-canonical ATR-dependent checkpoint response. *Nucleic Acids Res* 42, 11546-11559.
- Masai, H., Matsui, E., You, Z., Ishimi, Y., Tamai, K., and Arai, K. (2000). Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdks and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 bY Cdks. *J Biol Chem* 275, 29042-29052.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., and Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annual review of biochemistry* 79, 89-130.
- Masumoto, H., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2002). S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Nature* 415, 651-655.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.
- Mechali, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 728-738.
- Medema, R.H., and Macurek, L. (2012). Checkpoint control and cancer. *Oncogene* 31, 2601-2613.

- Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.L., Su, L.K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., and Tsai, L.H. (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* 11, 2909-2917.
- Michael, W.M., Ott, R., Fanning, E., and Newport, J. (2000). Activation of the DNA replication checkpoint through RNA synthesis by primase. *Science* 289, 2133-2137.
- Michalet, X., Ekong, R., Fougerousse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., van Slegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J.S., *et al.* (1997). Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 277, 1518-1523.
- Mihara, M., Shintani, S., Kiyota, A., Matsumura, T., and Wong, D.T. (2002). Cyclin-dependent kinase inhibitor (roscovitine) suppresses growth and induces apoptosis by regulating Bcl-x in head and neck squamous cell carcinoma cells. *International journal of oncology* 21, 95-101.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Richardson, P.G., Poulaki, V., Tai, Y.T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., *et al.* (2003). The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 101, 2377-2380.
- Modi, P.K., Komaravelli, N., Singh, N., and Sharma, P. (2012). Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons. *Molecular biology of the cell* 23, 3722-3730.
- Morrison, A.J., and Shen, X. (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 373-384.
- Myers, J.S., and Cortez, D. (2006). Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *J Biol Chem* 281, 9346-9350.
- Nagano, T., Hashimoto, T., Nakashima, A., Hisanaga, S., Kikkawa, U., and Kamada, S. (2013). Cyclin I is involved in the regulation of cell cycle progression. *Cell Cycle* 12, 2617-2624.
- Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y.F., Ayusawa, D., Oishi, M., and Mori, N. (1995). Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Exp Cell Res* 221, 534-542.
- Narasimha, A.M., Kaulich, M., Shapiro, G.S., Choi, Y.J., Sicinski, P., and Dowdy, S.F. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by monophosphorylation. *eLife*, e02872.
- Nicolay, N.H., Carter, R., Hatch, S.B., Schultz, N., Prevo, R., McKenna, W.G., Helleday, T., and Sharma, R.A. (2012). Homologous recombination mediates S-phase-dependent radioresistance in cells deficient in DNA polymerase ϵ . *Carcinogenesis* 33, 2026-2034.

- Niida, H., Katsuno, Y., Banerjee, B., Hande, M.P., and Nakanishi, M. (2007). Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol* 27, 2572-2581.
- Niu, H., Erdjument-Bromage, H., Pan, Z.Q., Lee, S.H., Tempst, P., and Hurwitz, J. (1997). Mapping of amino acid residues in the p34 subunit of human single-stranded DNA-binding protein phosphorylated by DNA-dependent protein kinase and Cdc2 kinase in vitro. *J Biol Chem* 272, 12634-12641.
- Nordlund, P., and Reichard, P. (2006). Ribonucleotide reductases. *Annual review of biochemistry* 75, 681-706.
- O'Hare, M.J., Kushwaha, N., Zhang, Y., Aleyasin, H., Callaghan, S.M., Slack, R.S., Albert, P.R., Vincent, I., and Park, D.S. (2005). Differential roles of nuclear and cytoplasmic cyclin-dependent kinase 5 in apoptotic and excitotoxic neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 8954-8966.
- Oakley, G.G., and Patrick, S.M. (2010). Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. *Frontiers in bioscience* 15, 883-900.
- Ochi, T., Wu, Q., and Blundell, T.L. (2014). The spatial organization of non-homologous end joining: from bridging to end joining. *DNA Repair (Amst)* 17, 98-109.
- Odajima, J., Wills, Z.P., Ndassa, Y.M., Terunuma, M., Kretschmannova, K., Deeb, T.Z., Geng, Y., Gawrzak, S., Quadros, I.M., Newman, J., *et al.* (2011). Cyclin E constrains Cdk5 activity to regulate synaptic plasticity and memory formation. *Developmental cell* 21, 655-668.
- Ohshima, T., and Mikoshiba, K. (2002). Reelin signaling and Cdk5 in the control of neuronal positioning. *Molecular neurobiology* 26, 153-166.
- Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J., and Kulkarni, A.B. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11173-11178.
- Olson, E., Nievera, C.J., Klimovich, V., Fanning, E., and Wu, X. (2006). RPA2 is a direct downstream target for ATR to regulate the S-phase checkpoint. *J Biol Chem* 281, 39517-39533.
- Ozeri-Galai, E., Lebofsky, R., Rahat, A., Bester, A.C., Bensimon, A., and Kerem, B. (2011). Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. *Mol Cell* 43, 122-131.
- Pacek, M., Prokhorova, T.A., and Walter, J.C. (2004). Cdk1: unsung hero of S phase? *Cell Cycle* 3, 401-403.
- Palma, J.P., Wang, Y.C., Rodriguez, L.E., Montgomery, D., Ellis, P.A., Bukofzer, G., Niquette, A., Liu, X., Shi, Y., Lasko, L., *et al.* (2009). ABT-888 confers broad in vivo activity in combination with temozolomide in diverse tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 7277-7290.

- Park, M.S., Ludwig, D.L., Stigger, E., and Lee, S.H. (1996). Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J Biol Chem* 271, 18996-19000.
- Park, S.Y., and Cheng, Y.C. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 could facilitate the religation of topoisomerase I-linked DNA inhibited by camptothecin. *Cancer Res* 65, 3894-3902.
- Parry, D., Guzi, T., Shanahan, F., Davis, N., Prabhavalkar, D., Wiswell, D., Seghezzi, W., Paruch, K., Dwyer, M.P., Doll, R., *et al.* (2010). Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics* 9, 2344-2353.
- Patel, A.G., Sarkaria, J.N., and Kaufmann, S.H. (2011). Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 3406-3411.
- Patrick, S.M., Oakley, G.G., Dixon, K., and Turchi, J.J. (2005). DNA damage induced hyperphosphorylation of replication protein A. 2. Characterization of DNA binding activity, protein interactions, and activity in DNA replication and repair. *Biochemistry* 44, 8438-8448.
- Patzke, H., and Tsai, L.H. (2002). Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29. *J Biol Chem* 277, 8054-8060.
- Paulsen, R.D., and Cimprich, K.A. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst)* 6, 953-966.
- Pepe, A., and West, S.C. (2014). MUS81-EME2 promotes replication fork restart. *Cell Rep* 7, 1048-1055.
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Molecular Cell* 37, 492-502.
- Peterson, S.E., Li, Y., Chait, B.T., Gottesman, M.E., Baer, R., and Gautier, J. (2011). Cdk1 uncouples CtIP-dependent resection and Rad51 filament formation during M-phase double-strand break repair. *J Cell Biol* 194, 705-720.
- Pines, J. (2006). Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends in cell biology* 16, 55-63.
- Poli, J., Tsaponina, O., Crabbe, L., Keszthelyi, A., Pantesco, V., Chabes, A., Lengronne, A., and Pasero, P. (2012). dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J* 31, 883-894.
- Pommier, Y., Redon, C., Rao, V.A., Seiler, J.A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., *et al.* (2003). Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutation research* 532, 173-203.
- Poon, R.Y., Lew, J., and Hunter, T. (1997). Identification of functional domains in the neuronal Cdk5 activator protein. *J Biol Chem* 272, 5703-5708.

- Pozo, K., Castro-Rivera, E., Tan, C., Plattner, F., Schwach, G., Siegl, V., Meyer, D., Guo, A., Gundara, J., Mettlach, G., *et al.* (2013). The role of Cdk5 in neuroendocrine thyroid cancer. *Cancer Cell* 24, 499-511.
- Qi, Z., Huang, Q.Q., Lee, K.Y., Lew, J., and Wang, J.H. (1995). Reconstitution of neuronal Cdc2-like kinase from bacteria-expressed Cdk5 and an active fragment of the brain-specific activator. Kinase activation in the absence of Cdk5 phosphorylation. *J Biol Chem* 270, 10847-10854.
- Rajesh, P., Litvinchuk, A.V., Pittman, D.L., and Wyatt, M.D. (2011). The homologous recombination protein RAD51D mediates the processing of 6-thioguanine lesions downstream of mismatch repair. *Molecular cancer research : MCR* 9, 206-214.
- Rath, S.L., and Senapati, S. (2013). Molecular basis of differential selectivity of cyclobutyl-substituted imidazole inhibitors against CDKs: insights for rational drug design. *PLoS One* 8, e73836.
- Reddy, G.P., and Fager, R.S. (1993). Replitase: a complex integrating dNTP synthesis and DNA replication. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 3, 255-277.
- Reinhardt, H.C., and Yaffe, M.B. (2013). Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 563-580.
- Renkawitz, J., Lademann, C.A., Kalocsay, M., and Jentsch, S. (2013). Monitoring homology search during DNA double-strand break repair in vivo. *Mol Cell* 50, 261-272.
- Ribas, J., Boix, J., and Meijer, L. (2006). (R)-roscovitine (CYC202, Seliciclib) sensitizes SH-SY5Y neuroblastoma cells to nutlin-3-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 312, 2394-2400.
- Rimmele, P., Komatsu, J., Hupe, P., Roulin, C., Barillot, E., Dutreix, M., Conseiller, E., Bensimon, A., Moreau-Gachelin, F., and Guillouf, C. (2010). Spi-1/PU.1 oncogene accelerates DNA replication fork elongation and promotes genetic instability in the absence of DNA breakage. *Cancer Res* 70, 6757-6766.
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., and Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66, 981-993.
- Rosales, J., Han, B., and Lee, K.Y. (2003). Cdk7 functions as a cdk5 activating kinase in brain. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 13, 285-296.
- Rosales, J.L., and Lee, K.Y. (2006). Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 28, 1023-1034.
- Russo, A.L., Kwon, H.C., Burgan, W.E., Carter, D., Beam, K., Weizheng, X., Zhang, J., Slusher, B.S., Chakravarti, A., Tofilon, P.J., *et al.* (2009). In vitro and in vivo radiosensitization of glioblastoma cells by the poly (ADP-ribose)

- polymerase inhibitor E7016. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 607-612.
- Saada, A. (2009). Fishing in the (deoxyribonucleotide) pool. *Biochem J* 422, e3-6.
- Saha, T., Ghosh, S., Vassilev, A., and DePamphilis, M.L. (2006). Ubiquitylation, phosphorylation and Orc2 modulate the subcellular location of Orc1 and prevent it from inducing apoptosis. *J Cell Sci* 119, 1371-1382.
- Saintigny, Y., Delacote, F., Vares, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbeck, D., and Lopez, B.S. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J* 20, 3861-3870.
- Sancar, A. (1996). DNA excision repair. *Annual review of biochemistry* 65, 43-81.
- Sanchez-Pulido, L., Diffley, J.F., and Ponting, C.P. (2010). Homology explains the functional similarities of Treslin/Ticrr and Sld3. *Current biology : CB* 20, R509-510.
- Santocanale, C., and Diffley, J.F. (1998). A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* 395, 615-618.
- Scholefield, G., Veening, J.W., and Murray, H. (2011). DnaA and ORC: more than DNA replication initiators. *Trends in cell biology* 21, 188-194.
- Schwab, R.A., Blackford, A.N., and Niedzwiedz, W. (2010). ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. *EMBO J* 29, 806-818.
- Scorah, J., and McGowan, C.H. (2009). Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms. *Cell Cycle* 8, 1036-1043.
- Sebesta, M., Burkovics, P., Juhasz, S., Zhang, S., Szabo, J.E., Lee, M.Y., Haracska, L., and Krejci, L. (2013). Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. *DNA Repair (Amst)* 12, 691-698.
- Sedgwick, B., Bates, P.A., Paik, J., Jacobs, S.C., and Lindahl, T. (2007). Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)* 6, 429-442.
- Shao, J., Liu, X., Zhu, L., and Yen, Y. (2013). Targeting ribonucleotide reductase for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* 17, 1423-1437.
- Shao, R.G., Cao, C.X., Zhang, H., Kohn, K.W., Wold, M.S., and Pommier, Y. (1999). Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. *EMBO J* 18, 1397-1406.
- Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004a). ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol* 6, 648-655.
- Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004b). Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* 3, 901-908.

- Shi, L., and Oberdoerffer, P. (2012). Chromatin dynamics in DNA double-strand break repair. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 811-819.
- Shi, W., Feng, Z., Zhang, J., Gonzalez-Suarez, I., Vanderwaal, R.P., Wu, X., Powell, S.N., Roti, J.L.R., Gonzalo, S., and Zhang, J. (2010). The role of RPA2 phosphorylation in homologous recombination in response to replication arrest. *Carcinogenesis* 31, 994-1002.
- Shiotani, B., and Zou, L. (2009). Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol Cell* 33, 547-558.
- Siddiqui, K., On, K.F., and Diffley, J.F. (2013). Regulating DNA replication in eukarya. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Sirbu, B.M., Couch, F.B., Feigerle, J.T., Bhaskara, S., Hiebert, S.W., and Cortez, D. (2011). Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks. *Genes & Development* 25, 1320-1327.
- Sleeth, K.M., Sorensen, C.S., Issaeva, N., Dziegielewski, J., Bartek, J., and Helleday, T. (2007). RPA mediates recombination repair during replication stress and is displaced from DNA by checkpoint signalling in human cells. *J Mol Biol* 373, 38-47.
- Smith, G.C., and Jackson, S.P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13, 916-934.
- Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 297, 599-602.
- Stephan, H., Concannon, C., Kremmer, E., Carty, M.P., and Nasheuer, H.P. (2009). Ionizing radiation-dependent and independent phosphorylation of the 32-kDa subunit of replication protein A during mitosis. *Nucleic Acids Res* 37, 6028-6041.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.
- Stigger, E., Drissi, R., and Lee, S.H. (1998). Functional analysis of human replication protein A in nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 273, 9337-9343.
- Stracker, T.H., Usui, T., and Petrini, J.H. (2009). Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 8, 1047-1054.
- Strock, C.J., Park, J.I., Nakakura, E.K., Bova, G.S., Isaacs, J.T., Ball, D.W., and Nelkin, B.D. (2006). Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res* 66, 7509-7515.
- Sugiyama, T., and Kowalczykowski, S.C. (2002). Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem* 277, 31663-31672.

- Sun, A.M., Li, C.G., Han, Y.Q., Liu, Q.L., Xia, Q., and Yuan, Y.W. (2013). X-ray irradiation promotes apoptosis of hippocampal neurons through up-regulation of Cdk5 and p25. *Cancer cell international* 13, 47.
- Syljuasen, R.G., Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2005). Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 25, 3553-3562.
- Tamulevicius, P., Wang, M., and Iliakis, G. (2007). Homology-directed repair is required for the development of radioresistance during S phase: interplay between double-strand break repair and checkpoint response. *Radiat Res* 167, 1-11.
- Tang, D., Chun, A.C., Zhang, M., and Wang, J.H. (1997). Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activation domain of neuronal Cdk5 activator. Evidence of the existence of cyclin fold in neuronal Cdk5a activator. *J Biol Chem* 272, 12318-12327.
- Tang, D., Yeung, J., Lee, K.Y., Matsushita, M., Matsui, H., Tomizawa, K., Hatase, O., and Wang, J.H. (1995). An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J Biol Chem* 270, 26897-26903.
- Taniguchi, Y., Pippin, J.W., Hagmann, H., Krofft, R.D., Chang, A.M., Zhang, J., Terada, Y., Brinkkoetter, P., and Shankland, S.J. (2012). Both cyclin I and p35 are required for maximal survival benefit of cyclin-dependent kinase 5 in kidney podocytes. *American journal of physiology Renal physiology* 302, F1161-1171.
- Tarricone, C., Dhavan, R., Peng, J., Areces, L.B., Tsai, L.H., and Musacchio, A. (2001). Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex. *Mol Cell* 8, 657-669.
- Taylor, W.R., and Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.
- Techer, H. (2012). Relation entre la réponse aux dommages a l'ADN et la dynamique de réplication chez les mammiferes : role du point de controle intra-S. Genetics. (Universite Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. French.).
- Techer, H., Koundrioukoff, S., Azar, D., Wilhelm, T., Carignon, S., Brison, O., Debatisse, M., and Le Tallec, B. (2013). Replication dynamics: biases and robustness of DNA fiber analysis. *J Mol Biol* 425, 4845-4855.
- Thompson, L.H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutation research* 751, 158-246.
- Thornton, T.M., and Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *International journal of biological sciences* 5, 44-51.
- Thu, Y.M., and Bielinsky, A.K. (2014). MCM10: one tool for all-Integrity, maintenance and damage control. *Seminars in cell & developmental biology* 30, 121-130.

- Tian, B., Yang, Q., and Mao, Z. (2009). Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death. *Nat Cell Biol* 11, 211-218.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., and Burma, S. (2009). Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. *EMBO Rep* 10, 629-635.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Catherine Hardebeck, M., Ilcheva, M., Vanessa Camacho, C., Louise Harris, J., Porteus, M., Llorente, B., Khanna, K.K., and Burma, S. (2014). Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice. *Nature communications* 5, 3561.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A., and Nishida, E. (2001). Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 410, 215-220.
- Treuner, K., Findeisen, M., Strausfeld, U., and Knippers, R. (1999). Phosphorylation of replication protein A middle subunit (RPA32) leads to a disassembly of the RPA heterotrimer. *J Biol Chem* 274, 15556-15561.
- Trujillo, K.M., Yuan, S.S., Lee, E.Y., and Sung, P. (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* 273, 21447-21450.
- Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.Y., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M.W., and Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7720-7725.
- Tsai, L.H., Delalle, I., Caviness, V.S., Jr., Chae, T., and Harlow, E. (1994). p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371, 419-423.
- Tubiana, M. (2008). Radiobiologie. Radiothérapie et radioprotection: bases fondamentales. 502.
- Tuduri, S., Tourriere, H., and Pasero, P. (2010). Defining replication origin efficiency using DNA fiber assays. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 18, 91-102.
- Turner, N.C., Lord, C.J., Iorns, E., Brough, R., Swift, S., Elliott, R., Rayter, S., Tutt, A.N., and Ashworth, A. (2008). A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *EMBO J* 27, 1368-1377.
- Unsal-Kacmaz, K., Chastain, P.D., Qu, P.P., Minoo, P., Cordeiro-Stone, M., Sancar, A., and Kaufmann, W.K. (2007). The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol Cell Biol* 27, 3131-3142.

- Uringa, E.J., Youds, J.L., Lisaingo, K., Lansdorp, P.M., and Boulton, S.J. (2011). RTEL1: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 39, 1647-1655.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22, 5612-5621.
- van Hattum, H., and Waldmann, H. (2014). Chemical Biology Tools for Regulating RAS Signaling Complexity in Space and Time. *Chemistry & biology* 21, 1185-1195.
- Vassin, V.M., Wold, M.S., and Borowiec, J.A. (2004). Replication protein A (RPA) phosphorylation prevents RPA association with replication centers. *Mol Cell Biol* 24, 1930-1943.
- Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2006). Radiation dose-rate effects, endogenous DNA damage, and signaling resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17874-17879.
- Walter, J., and Newport, J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* 5, 617-627.
- Wang, Q., Goldstein, M., Alexander, P., Wakeman, T.P., Sun, T., Feng, J., Lou, Z., Kastan, M.B., and Wang, X.F. (2014). Rad17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks. *EMBO J* 33, 862-877.
- Wei, X., Samarabandu, J., Devdhar, R.S., Siegel, A.J., Acharya, R., and Berezney, R. (1998). Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science* 281, 1502-1506.
- Williams, G.J., Hammel, M., Radhakrishnan, S.K., Ramsden, D., Lees-Miller, S.P., and Tainer, J.A. (2014). Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair (Amst)* 17, 110-120.
- Williams, G.J., Lees-Miller, S.P., and Tainer, J.A. (2010). Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 9, 1299-1306.
- Williams, R.S., Moncalian, G., Williams, J.S., Yamada, Y., Limbo, O., Shin, D.S., Grocock, L.M., Cahill, D., Hitomi, C., Guenther, G., *et al.* (2008). Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell* 135, 97-109.
- Willis, N., and Rhind, N. (2009). Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell division* 4, 13.
- Wilson, M.S., Madala, S.K., Ramalingam, T.R., Gochuico, B.R., Rosas, I.O., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2010). Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of experimental medicine* 207, 535-552.

- Wohlbold, L., and Fisher, R.P. (2009). Behind the wheel and under the hood: functions of cyclin-dependent kinases in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 8, 1018-1024.
- Wold, M.S., and Kelly, T. (1988). Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2523-2527.
- Wood, R.D. (1997). Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 272, 23465-23468.
- Wu, X., Yang, Z., Liu, Y., and Zou, Y. (2005). Preferential localization of hyperphosphorylated replication protein A to double-strand break repair and checkpoint complexes upon DNA damage. *Biochem J* 391, 473-480.
- Wyatt, H.D., and West, S.C. (2014). Holliday Junction Resolvases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6.
- Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71, 505-514.
- Xu, B., Kim, S., and Kastan, M.B. (2001). Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 21, 3445-3450.
- Xu, S., Li, X., Gong, Z., Wang, W., Li, Y., Nair, B.C., Piao, H., Yang, K., Wu, G., and Chen, J. (2014). Proteomic Analysis of the Human CDK Family Reveals a Novel CDK5 Complex Involved in Cell Growth and Migration. *Molecular & cellular proteomics : MCP*.
- Yamada, M., Saito, T., Sato, Y., Kawai, Y., Sekigawa, A., Hamazumi, Y., Asada, A., Wada, M., Doi, H., and Hisanaga, S. (2007). Cdk5--p39 is a labile complex with the similar substrate specificity to Cdk5--p35. *Journal of neurochemistry* 102, 1477-1487.
- Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H., and Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nature genetics* 30, 285-289.
- Yeeles, J.T., Poli, J., Marians, K.J., and Pasero, P. (2013). Rescuing stalled or damaged replication forks. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a012815.
- Yekezare, M., Gomez-Gonzalez, B., and Diffley, J.F. (2013). Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. *J Cell Sci* 126, 1297-1306.
- Yeo, J.E., Lee, E.H., Hendrickson, E.A., and Sobeck, A. (2014). CtIP mediates replication fork recovery in a FANCD2-regulated manner. *Hum Mol Genet* 23, 3695-3705.
- Ying, S., Hamdy, F.C., and Helleday, T. (2012). Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Res* 72, 2814-2821.
- You, Z., and Bailis, J.M. (2010). DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends in cell biology* 20, 402-409.

- Yuan, J., Eckerdt, F., Bereiter-Hahn, J., Kurunci-Csacsko, E., Kaufmann, M., and Strebhardt, K. (2002). Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 21, 8282-8292.
- Yuzhakov, A., Kelman, Z., Hurwitz, J., and O'Donnell, M. (1999). Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *EMBO J* 18, 6189-6199.
- Zafar, F., Seidler, S.B., Kronenberg, A., Schild, D., and Wiese, C. (2010). Homologous recombination contributes to the repair of DNA double-strand breaks induced by high-energy iron ions. *Radiat Res* 173, 27-39.
- Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16, 2-9.
- Zernik-Kobak, M., Vasunia, K., Connelly, M., Anderson, C.W., and Dixon, K. (1997). Sites of UV-induced phosphorylation of the p34 subunit of replication protein A from HeLa cells. *J Biol Chem* 272, 23896-23904.
- Zhang, Y., and Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer* 134, 1013-1023.
- Zheng, M., Leung, C.L., and Liem, R.K. (1998). Region-specific expression of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and its activators, p35 and p39, in the developing and adult rat central nervous system. *Journal of neurobiology* 35, 141-159.
- Zhou, Y., Caron, P., Legube, G., and Paull, T.T. (2014). Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res* 42, e19.
- Zitouni, S., Nabais, C., Jana, S.C., Guerrero, A., and Bettencourt-Dias, M. (2014). Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 433-452.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.

ABSTRACT

Cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) is a determinant of sensitivity to PARP inhibitors and ionizing radiation (IR) and is required for the intra-S DNA damage checkpoint. It is not however directly implicated in strand break repair suggesting a role in the earlier steps of checkpoint activation. We report here that Cdk5-depleted (Cdk5-KD) HeLa cells show higher sensitivity to IR when irradiated in S-phase, and to chronic hydroxyurea (HU) exposure, 5-fluorouracil and 6-thioguanine. Cdk5-KD cells show altered basal S-phase dynamics caused by a slower replication velocity and fewer active origins per megabase of DNA, however they show a faster recovery from an HU block. This was accompanied by impaired RPA-32 priming serine 29 and serine 33 phosphorylations and SMC1-Serine 966 phosphorylation as well as lower levels of DNA damage assessed by the alkaline Comet assay, gamma-H2AX signal intensity, RPA and Rad51 foci and RPA-32 serine 4 and serine 8 phosphorylation and levels of sister chromatid exchanges. In vitro kinase assays coupled with mass spectrometry showed that Cdk5 can phosphorylate RPA-32 on serines 23, 29, and 33. In addition lower Cdk5 levels were associated with longer metastasis free survival in breast cancer patients and lower cell survival in Cdk5 depleted breast tumor cells after treatment with IR and a PARP inhibitor. Taken together, these results show that Cdk5 is necessary for basal replication and replication stress checkpoint activation and opens up interesting clinical opportunities to enhance tumor cell killing in certain populations of breast cancer patients through agents that generate replication stress.

KEY WORDS: Cdk5, Hydroxyurea, Replication stress, PARP-1, Ionizing Radiation

RESUME

La kinase dépendante des cyclines 5 (Cdk5) est un facteur de sensibilité aux inhibiteurs de PARP et aux rayonnements ionisants (RI), elle est nécessaire pour le point de contrôle du cycle cellulaire en phase S. Cependant, elle n'est pas directement impliquée dans la réparation des cassures de brin d'ADN, suggérant un rôle dans les étapes plus précoces de la signalisation des dommages. Nous rapportons ici que des cellules HeLa déplétées pour Cdk5 (Cdk5 KD) montrent une grande sensibilité aux RI surtout lorsqu'elles sont irradiées en phase S, au 5-fluoro-uracile, à la 6-thioguanine et à une exposition chronique à l'hydroxyurée (HU). Les cellules Cdk5 KD montrent une altération de la dynamique de la phase S causée par une vitesse de réplication plus lente et une réduction des origines actives par mégabase d'ADN. En revanche, après un traitement au HU, ces cellules sortent plus rapidement du blocage en phase S. Ceci s'accompagne d'une déficience de la phosphorylation de RPA-32 sur les sérines 29 et 33 et de SMC1 sur la sérine 966 ainsi que d'une réduction du niveau de dommages de l'ADN évalués par le test des comètes alcalines, de l'intensité du signal gamma-H2AX, des foyers RPA, Rad51 et RPA sur les sérines 4 et 8 ainsi que du niveau d'échanges de chromatides sœurs. Des essais kinase in vitro couplés à la spectrométrie de masse ont montré que Cdk5 peut phosphoryler RPA-32 sur ses sérines 23, 29, et 33. De plus, des niveaux inférieurs d'expression de Cdk5 ont été associés à une meilleure survie sans métastases chez des patientes atteintes d'un cancer du sein et à une réduction de la survie des cellules de tumeurs du sein déplétées pour Cdk5 après un traitement aux RI et en présence d'un inhibiteur de PARP. Globalement, ces résultats montrent que Cdk5 est nécessaire pour la réplication basale et l'activation du point de contrôle en phase S en réponse à un stress réplicatif, ouvrant des perspectives cliniques intéressantes pour améliorer la destruction des cellules tumorales dans certaines populations de patientes atteintes de cancer du sein grâce à des agents qui génèrent un stress réplicatif.

MOTS-CLES : Cdk5, Hydroxyurée, Stress Réplicatif, PARP-1, Rayonnements ionisants
